

**Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften**  
**der Naturwissenschaftlichen Fakultät III**  
**der**  
**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

Biodiversität im Wirt-Pathogen-System Apfel/ Apfelmehltau  
(*Malus* spp./ *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) E.S. Salmon):  
Variabilität des Apfelmehltaus auf molekularer Ebene, in der Virulenz auf *Malus*-  
Genotypen mit pyramidisierten Resistenzen sowie in Cytochrom *b*-bedingter  
Strobilurinresistenz.

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von

Diplomagraringenieurin Silke Sabine Lesemann  
geb. am 18.09.1974 in Braunschweig

**Gutachter: Prof. Dr. Holger B. Deising**  
**Prof. Dr. M.- Viola Hanke**  
**Prof. Dr. Klaus Pillen**

Verteidigung am: 24. Januar 2011

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERBLICK</b> .....	<b>6</b>
	2.1 Biologie des Apfelmehltaus ( <i>Podosphaera leucotricha</i> (Ell. et Ev.) Salm.)	6
	2.2 Resistenz gegenüber Apfelmehltau in Wirtspflanzen der Gattung <i>Malus</i>	8
	2.3 Rassenbildung bei pilzlichen Pathogenen	13
	2.4 Fungizidresistenz bei Pflanzenpathogenen	16
	2.4.1 Hintergrund.....	16
	2.4.2 Quantitative und qualitative Fungizidresistenz .....	18
	2.4.3 Strobilurin-Fungizide.....	19
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>22</b>
	3.1 Biologisches Material	22
	3.1.1 <i>In vitro</i> -Kulturen der Wirtspflanze <i>Malus</i> .....	22
	3.1.2 Testsortiment der Gattung <i>Malus</i> zur Virulenztestung von Apfelmehltau-Isolaten	23
	3.1.3 Herstellung von Einsporisolaten von <i>Podosphaera leucotricha</i> .....	25
	3.1.4 Erhaltung und Vermehrung von Pilzisolaten .....	27
	3.1.5 Pathogenitätstestung der Pilzisolate auf dem <i>Malus</i> -Testsortiment.....	28
	3.1.6 Analyse der Fungizidresistenz von Mehltausisolaten.....	29
	3.1.7 Anzucht und Kultur von Bakterien zur Transformation .....	30
	3.2 Molekularbiologische Methoden	31
	3.2.1 Präparation pilzlicher DNA von frischen Blattproben.....	31
	3.2.2 Präparation pilzlicher DNA von getrockneten Blattproben und Rinde .....	31
	3.2.3 Agarose-Gel-Elektrophorese .....	32
	3.2.4 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese .....	32
	3.2.5 Entwicklung und Anwendung molekularer Marker .....	32
	3.2.6 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Fragmenten .....	39
	3.2.7 Auswertung der Sequenzdaten .....	39
	3.2.8 Analyse des Cytochrom <i>b</i> - Gens mit molekularen Methoden .....	40
	3.3 Statistik	41
	3.3.1 Auswertung der Markerdaten und Erstellung von Dendrogrammen .....	41
	3.3.2 Auswertung Fungizid-Sensitivitätsbestimmungen .....	41
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>41</b>
	4.1 Pathogenitätstestung der Pilzisolate auf dem <i>Malus</i> -Testsortiment	41
	4.1.1 Reaktion der <i>Malus</i> -Genotypen auf <i>P. leucotricha</i> -Isolate .....	41
	4.1.2 Aggressivität der Apfelmehltau-Isolate .....	45
	4.1.3 Reaktion der <i>Malus</i> -Genotypen mit definierter Resistenz auf Mehltausisolate .....	46
	4.2 Molekularbiologische Methoden zur Differenzierung von Mehltausisolaten	47
	4.2.1 Entwicklung und Anwendung molekularer Marker .....	47
	4.2.2 Erstellung von Dendrogrammen basierend auf Markerdaten .....	53
	4.3 Untersuchungen zur Fungizidresistenz von Mehltausisolaten	56
	4.3.1 Molekularbiologische Methoden .....	56
	4.3.2 Analyse der Fungizidsensitivität von Mehltausisolaten in Blatttestungen und Sporenceimtests.....	61
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>65</b>
	5.1 Phytopathologische Charakterisierung von <i>Podosphaera leucotricha</i> und Bewertung der Resistenz in der Gattung <i>Malus</i> gegenüber verschiedenen Isolaten des Apfelmehltau	65
	5.1.1 Pathogenität der Mehltausisolate .....	65
	5.1.2 Anfälligkeit der <i>Malus</i> -Genotypen.....	70
	5.1.3 Pyramidisierung von Resistenzgenen .....	73

5.1.4 Vergleichende Betrachtung von Feld- und Labortests auf Resistenz.....	74
5.1.5 Konsequenzen für die Züchtung.....	75
5.2 Molekulare Charakterisierung von <i>Podosphaera leucotricha</i> .....	77
5.2.1 Entwicklung von SSR-Markern.....	77
5.2.2 Molekulare Charakterisierung mittels AFLP-, RAPD- und SCAR-Markern .....	79
5.3 Cytochrom <i>b</i> -basierte Fungizidresistenz.....	84
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>88</b>
<b>7 SUMMARY .....</b>	<b>90</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>
<b>9 ANHANG.....</b>	<b>105</b>
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	105
9.2 Tabellenverzeichnis.....	106
9.3 Verzeichnis der Tabellen im Anhang.....	106
9.4 Tabellen im Anhang.....	108
9.5 Verwendete Chemikalien, Puffer und Kulturmedien.....	119
9.5.1 Chemikalien.....	119
9.5.2 Puffer und Lösungen .....	119
9.5.3 Medien.....	120
9.6 Abkürzungsverzeichnis.....	121

## **1 Einleitung**

Der Apfelmehltau *Podosphaera leucotricha* ((Ell.et Ev.) Salm.) ist neben dem Apfelschorf *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. der wichtigste pilzliche Schaderreger im Erwerbsanbau und verursacht Apfelanbauern weltweit große Ertragseinbußen. Der Befall mit dem Pathogen führt zu einer Schwächung der Bäume, lässt sich aber durch intensiven Einsatz von Fungiziden reduzieren. Im Zuge der sich entwickelnden nachhaltigeren Produktionsweisen mit verringertem Einsatz von Pflanzenschutzmitteln wird jedoch zunehmend deutlich, dass neben dem Apfelschorf auch der Apfelmehltau ein Problem darstellt, welches nicht allein durch Einsatz von Chemikalien gelöst werden kann. Zudem scheint in manchen Regionen der Apfelmehltau verstärkt als Problem aufzutreten, möglicherweise vor dem Hintergrund des sich abzeichnenden Klimawandels. Unter wärmeren Wetterbedingungen während der Vegetationsperiode findet der Pilz günstige Wachstumsbedingungen. Neben dem Einsatz von Fungiziden bietet die Nutzung von in der Wirtspflanze vorhandenen Resistenzen eine Möglichkeit, den Schaden, der durch das Pathogen verursacht wird, zu verringern. In der Gattung *Malus* treten verschiedene wirksame Resistenzen gegen den Apfelmehltau auf und einige, meist monogen bedingte Resistenzen, wurden bereits aus Wildarten erfolgreich in Züchtungsmaterial eingekreuzt. Jedoch ist der Züchtungsweg vom Wildapfel zum Kulturapfel sehr weit und es gibt bislang kaum Sorten, in denen Mehlttauresistenz erfolgreich integriert wurde. Zudem wurde für manche der beschriebenen Resistenzgene bereits von einer Durchbrechung der Resistenz durch virulente Stämme des Pathogens berichtet. Um vorhandene Resistenzen in der Züchtung erfolgreicher nutzen zu können, ist ein umfassendes Wissen über die Variabilität des Pathogenes, besonders hinsichtlich auftretender Virulenzen, von Vorteil.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des EU-INCO-Projektes SMADIA (sustainable production of apple and pear in Asia: understanding biology of scab and powdery mildew for developing integrated approaches of disease management) erstellt. In diesem Projekt sollten Grundlagen für die Entwicklung eines umweltfreundlicheren Kernobstanbaus in Asien (China und Indien) erarbeitet werden. China und Indien sind sehr wichtige Apfel-Anbauregionen. China allein produzierte mit etwa 27,9 Millionen t die Hälfte der gesamten Weltproduktion an Apfel (rund 56,5 Millionen t in 2007; <http://faostat.fao.org>), wovon bislang jedoch nur ein geringer Teil exportiert wird. Die Produktion in Indien ist mit 2,0 Mio t in etwa vergleichbar mit der in Italien (2,2 Mio t) und Frankreich (2,14 Mio t), in Deutschland wurde mit 1,07 Mio t etwa die Hälfte davon produziert. Damit stand Deutschland in 2007 weltweit an der 12. Stelle in der Produktion von Apfel. Die in Europa gängigsten Sorten wie 'Royal Gala', 'Jonagold', 'Elstar' und 'Fuji' haben auch in Asien die lokalen asiatischen Sorten weitgehend verdrängt. Daher ist es für Züchter in Europa weiterhin interessant zu sehen, ob neugezüchtete Sorten auch unter den Bedingungen in Asien erfolgreich sein können. So müssen z.B. Resistenzen

auch gegen dort auftretende Rassen von Pathogenen wirksam sein. Außerdem besteht die Gefahr, dass durch eine Erweiterung des Exportes von Obst aus Asien dort beheimatete Rassen nach Europa eingeführt werden. Deshalb ist es wichtig, einen Überblick zu bekommen, ob und wie sich Pathogenrassen in beiden Regionen unterscheiden.

Diese Arbeit hatte zum Ziel, die Biodiversität des Erregers des Apfelmehltaus in Asien zu untersuchen und mit der in Europa zu vergleichen. Dazu wurden zum einen molekulare Marker für den Apfelmehltau entwickelt und angewendet, um die genetische Variabilität zwischen Isolaten aus verschiedenen Herkunftsn aufzudecken. Zum anderen wurde in Infektionsversuchen untersucht, ob Unterschiede in der Virulenz des Erregers zwischen Isolaten aus Europa und Asien bestehen. Diese Virulenztestungen wurden als Blatt-Infektionstests *in vitro* auf einem Sortiment von verschiedenen anfälligen und resistenten *Malus*-Genotypen durchgeführt, um einen Überblick über das vorhandene Spektrum von Virulenzen zu bekommen. Dabei wurde ein Schwerpunkt auf die Testung von *Malus*-Züchtungsmaterial gelegt, welches verschiedene Resistenzgene zum Teil einzeln, zum Teil aber auch in Kombination, also "pyramidiert", trägt. Mit dieser Kombination verschiedener Resistenzgene soll ein Durchbrechen der Resistenz verhindert bzw. für das Pathogen erschwert werden. Darüberhinaus wurden *Malus*-Sorten untersucht, die aufgrund polygener Resistenz wenig anfällig gegenüber dem Apfelmehltau sind. Auch ihr möglicher Nutzen für die Züchtung sollte erkundet werden.

Ein weiterer Teil der Arbeit befasste sich mit der Untersuchung einer möglichen Resistenz des Apfelmehltaus gegenüber Strobilurin-Fungiziden. Die Wirkung der Strobilurin-Fungizide beruht auf der Hemmung der Zellatmung der Schaderreger und sie haben sich als wichtige protektive Mittel mit langer Wirkungsdauer herausgestellt. Nachdem die Anzahl der im Anbau zugelassenen Fungizide stetig abnimmt, wird es umso wichtiger, dass die noch verfügbaren Mittel ihre Wirksamkeit nicht verlieren, um eine Bekämpfung der Krankheiten im Erwerbsanbau weiterhin sicherzustellen. Für verschiedene andere Kulturen wurde eine mutationsbedingte Resistenz von Pathogenen gegenüber den Strobilurin-Fungiziden festgestellt. Berichte aus verschiedenen Anbauregionen deuten ein Nachlassen der Wirkung der Strobilurine auch im Apfelanbau an. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob auch im Apfelmehltau eine häufige Form der Strobilurinresistenz, bedingt durch eine Mutation im mitochondrialen Cytochrom *b*-Gen (G143A), auftritt. Dazu wurden zum einen molekulare Analysen durchgeführt, um aufzudecken, ob die Mutation auftritt. Zum anderen wurden Fungizidwirkungstests mit einzelnen Isolaten durchgeführt, um zu überprüfen, ob mit dem Auftreten der Mutation auch eine Reduktion der fungiziden Wirkung des untersuchten Strobilurin-Fungizides einhergeht.

## **2 Literaturüberblick**

### **2.1 Biologie des Apfelmehltaus (*Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm.)**

Der Ascomycet *Podosphaera leucotricha* gehört zu den Echten Mehltäupilzen (*Erysiphales*) und wurde 1888 zum ersten Mal von Ellis und Everhart beschrieben, später von Salmon (1900) näher charakterisiert (Schander, 2005). Wie die meisten anderen Mehltäupilze hat auch der Apfelmehltau einen sehr engen Wirtspflanzenkreis und nur die Pflanzen der Gattung *Malus* stehen als mögliche Wirte zur Verfügung. Manche Autoren berichteten jedoch auch über die Möglichkeit einer Infektion von Birne, Quitte und Mispel (Smith et al., 1988; Spotts, 1984). Die Ernährungsweise des Pilzes ist obligat biotroph, d. h. der Pilz ist in allen Lebensphasen auf das Vorhandensein der Wirtspflanze angewiesen. Er bezieht Nährstoffe über Haustorien, die in die Zellen der Epidermis eingesenkt werden, wobei die Wirtszelle am Leben bleibt. Der Pilz kann alle jungen, sich noch entwickelnden Pflanzenorgane befallen. In erster Linie sind junge Blätter an den Triebspitzen betroffen, aber auch die jungen Triebe selbst. Auch Blüten und Früchte können besiedelt werden. Als vorrangiges Symptom zeigt sich ein dichter, weißer, mehligartiger Belag auf der Oberfläche, bestehend aus dem Myzel und Konidien des Pilzes. Stark befallene Blätter weisen Verkrüppelungen auf, sind eingerollt oder verschmälert. Die Blätter trocknen ein und fallen ab, so dass die Triebe verkahlen und sogenannte "Mehltaukerzen" entstehen (Smith et al., 1988). Auf befallenen Früchten ruft der Befall mit Mehltau Berostung hervor. Der Hauptschaden besteht in der starken Schwächung der Bäume in Folge der Reduktion der Assimilationsleistung und des vegetativen Wachstums (Ellis und Ferree, 1981; Smith et al., 1988). Jedoch können auch die Berostung der Früchte und eine reduzierte Fruchtgröße zu Ertragseinbußen führen (Smith et al., 1988). Weiterer Schaden ist durch die Überwinterung des Pilzes in den Knospenschuppen der Triebe bedingt. Besiedelte Knospen sind weniger kompakt und daher anfälliger für Frostschäden und sterben häufiger ab (Smith et al., 1988; Spotts et al., 1981).

Die Bildung der sexuellen Hauptfruchtform in Form von Perithezien findet unter günstigen Bedingungen und auf hochanfälligen Apfelsorten statt. Der Pilz ist heterothallisch, d.h. es kommen verschiedene Formen vor, die sexuell kompatibel sind und zur Bildung der Hauptfruchtform führen (Smith et al., 1988). Die Bedeutung der sexuellen Phase für die Epidemiologie ist nicht ausreichend geklärt (Berwith, 1936; Smith et al., 1988; Stalder, 1954). Zumeist wurde eine Rolle der Ascosporen bei der Primärinfektion ausgeschlossen, da in Versuchen eine Keimung der Ascosporen bislang nur einmal beobachtet werden konnte (Tsuyama et al., 1967). Gessler et al. (2000) und Urbanietz und Dunemann (2005) fanden jedoch in molekularen Analysen des Erregers Hinweise darauf, dass die Bedeutung der sexuellen Phase unterschätzt wurde. Die weitaus größte Bedeutung für die Ausbreitung des Pilzes in Primärinfektionen kommt jedoch der asexuellen Vermehrung über Konidien zu. Der

Pilz überwächst die Oberfläche der Pflanzenorgane mit einem Hyphengeflecht (Mycel). An diesem entwickeln sich Konidienträger, von denen die asexuell gebildeten Konidien in großen Mengen abgegeben werden (Smith et al., 1988). Die Konidien werden mit dem Wind verbreitet und ein Transport über große Distanzen ist möglich. Untersuchungen am Getreidemehltau und anderen pilzlichen Pathogenen mit Windverbreitung haben gezeigt, dass die Sporen in höheren Luftschichten mehrere hundert Kilometer transportiert werden können (Aylor, 1986). Beim Rebenmehltau *Erysiphe necator* wird von einer eher geringen Kapazität der Windverbreitung ausgegangen (Delye et al., 1995), ähnliche Vorgänge sind für den Apfelmehltau nicht untersucht. Dennoch ist ein Transport von Sporen über weite Strecken nicht auszuschließen. Über eine Verbreitung von Ascosporen des Apfelmehltaus ist keine Aussage möglich, da keine Informationen vorliegen.

Der Pilz überwintert als Mycel in Blatt- und Blütenknospen und entwickelt sich im Frühjahr zur Zeit des Austriebs der Knospen auf dem sich entwickelnden Epidermisgewebe. Diese Art des Befalls wird als Primärbefall bezeichnet (Smith et al., 1988; Stalder, 1954). Die schon frühzeitig gebildeten Konidien infizieren weiteres junges Pflanzengewebe und diese Art der Infektion findet während der gesamten Vegetationsperiode statt, solange anfälliges Gewebe zur Verfügung steht (Sekundärinfektion). Eine Infektion der neugebildeten Knospen kann sowohl über einwachsendes Mycel, als auch durch Konidien auf den noch nicht abgeschlossenen Knospen erfolgen (Schander, 2005; Smith et al., 1988).

Optimale Bedingungen zur Vermehrung findet der Pilz bei warmem Wetter mit relativ hoher Luftfeuchte (höher als 90%) im Frühsommer bis Sommer (Berwith, 1936; Smith et al., 1988). Die optimale Temperatur zum Wachstum liegt bei 20 bis 22°C (Kaspers, 1967; Xu und Butt, 1998), die Keimung wird durch Berührungsreize der Blattoberfläche und durch Licht gefördert. Hohe Temperaturen, direkte Sonneneinstrahlung und freies Wasser dagegen schaden (Berwith, 1936; Kaspers, 1967; Schander, 2005). Tiefe Temperaturen und Wasser wirken nicht keimabtötend, sondern keimverzögernd. In *In vitro*-Versuchen war die Keimrate relativ niedrig, so dass nach 24 Stunden nur ca. 50% der Sporen gekeimt waren (Kriehoff, 1995). Unter günstigen Bedingungen bilden sich erste Haustorien bereits 45-48 Stunden nach der Keimung. Die Konidienbildung beginnt nach vier bis acht Tagen (Berwith, 1936; Schander, 2005), dann sind auch die ersten Kolonien makroskopisch sichtbar.

Die Keimung der Sporen erfolgt nicht oder nur in sehr geringem Umfang auf Oberflächen wie Glas, Kunststoff oder auch verschiedenen Nährmedien (Berwith, 1936; Caffier et al., 1996). Cimanowski (1970) beobachtete die Keimung von Konidien auf Eichenblättern, jedoch fand keine Penetration des Gewebes statt. Keimtests können auf isolierten Kutikeln von *Malus* durchgeführt werden, und eine Keimung wurde auch auf Kutikeln anderer Pflanzenarten beobachtet, wie z.B. *Stephanotis* (J. Montag, Hannover, persönliche Mitteilung). Welche Faktoren die Keimung und Bildung von Appressorien stimulieren, ist nicht bekannt.

Keimtests von *Blumeria graminis* (Getreidemehltau) und *Erysiphe pisi* (Erbsenmehltau) wurden an Spinnwebfäden und auf verschiedenen Oberflächen durchgeführt, um einen Oberflächenreiz auf die Sporen zu untersuchen. Als Ergebnis zeigte sich, dass die Keimung der Sporen ohne Oberflächenkontakt stattfindet, dass jedoch für die Bildung eines Appressoriums eine geeignete Oberfläche notwendig ist (Green et al., 2002). Für die Penetration des Gewebes und Ausbildung von Haustorien ist der geeignete Wirt Voraussetzung.

Wo das ursprüngliche Genzentrum und somit der Ursprungsort des Apfelmehltau liegen, ist unklar. In älterer Literatur fand sich der Hinweis, dass der Apfelmehltau vermutlich auf anfälligen Sorten aus Amerika nach Europa eingeführt wurde (Lespinasse et al., 1976). Mittlerweile wird jedoch eher vermutet, dass er ursprünglich aus Asien stammt. Der Apfelmehltau ist heute weltweit verbreitet und tritt in allen Anbauregionen für Kernobst auf und findet in den Anbausystemen der intensiven Obstproduktion günstige Vermehrungsbedingungen, unterstützt dadurch, dass fast alle in großem Umfang angebauten Sorten anfällig sind (Lespinasse et al., 1976; Schander, 2005; Smith et al., 1988).

## **2.2 Resistenz gegenüber Apfelmehltau in Wirtspflanzen der Gattung *Malus***

Schon 1912 wurde vom Deutschen Pomologenverein die Resistenz gegenüber dem Mehltau als eines der wichtigsten von 20 Zuchtzielen für den Apfel genannt (Schander, 2005). Dabei gilt die Resistenz im Allgemeinen nicht als Hauptziel, sondern wird eher als Bonus für eine Sorte angesehen, die in den wichtigeren Eigenschaften wie Qualität, Fruchtgröße und Ertrag eine Verbesserung zu bisherigen Sorten darstellt (Alston, 1976; James et al., 2004). Man unterscheidet zwischen vollständiger Resistenz und der sogenannten "Feldresistenz". Als feldresistent bezeichnete Pflanzen können leichten Befall mit dem Schädling oder Pathogen aufweisen, dieser führt aber in der Regel nicht zu einem wirtschaftlichen Schaden. In langjährigen Kulturen wie dem Apfel, in denen die Pflanzen eine durchschnittliche Standdauer von oft über 20 Jahren haben, ist es unerlässlich, dass eine Sorte, falls die Resistenz ihre Wirkung verliert, mit dem üblichen Pflanzenschutzmittel-Einsatz weiterhin gute Erträge liefert (Alston, 1976). Je nach Sorte wird beim Mehltau eine Befallsstärke von weniger als 10 bis 20% befallener Blätter von Anbauern als ökonomisch akzeptierbarer Schaden angesehen (Jeger und Butt, 1986; Smith et al., 1988).

In einer Befragung von 42 Apfelzüchtern aus 29 Ländern weltweit ergab sich, dass die Resistenzzüchtung heutzutage meist nach der Qualitätsverbesserung an zweiter Stelle der Prioritäten genannt wird (Laurens, 1999). Resistente Sorten bieten einige sozio-ökonomische Vorteile, dadurch, dass sie helfen, Produktionskosten zu verringern und unerwünschte Nebeneffekte auf Anwender und Umwelt zu reduzieren. Dies geschieht, indem Ausstattung,

Treibstoff und Arbeitskraft gespart werden. Tatsächlich aber beträgt die Ersparnis an Pflanzenschutzmitteleinsparung für den Anbauer nur etwa 4% des jährlichen Ertrages (Mervin et al., 1994). Die Konsumentenbedenken hinsichtlich der massiven Anwendung von Pflanzenschutzmitteln waren ein Hauptfaktor, der die Resistenzzüchtung als Hauptziel bestärkte (Laurens, 1999). Dies hat sich jedoch bislang nicht im Konsumentenverhalten niedergeschlagen. Auch über 50 Jahre nach erfolgreicher Einkreuzung des Schorfresistenzgenes *Vf* aus *Malus floribunda* finden resistente Sorten keine besonders große Akzeptanz. Es gibt zwar bereits verschiedene resistente Sorten, die mit relativ guter Qualität aufwarten können, jedoch scheint die Qualität im Vergleich mit anderen Sorten nicht auszureichen, um Anbauer, Handel und Konsumenten zu überzeugen. Ausnahme ist die schorfresistente Sorte 'Topaz', die zu den aktuellen Spitzensorten gezählt wird (Gessler et al., 2006).

In einigen Wildarten der Gattung *Malus* sind wirksame Resistenzen gegen den Mehltau zu finden. Eine Reihe von Resistenzgenen wurde beschrieben (Tabelle 1), dabei wurden die Resistenzgene *PI1* und *PI2* als erste entdeckt und näher charakterisiert, weitere folgten. Für Kreuzungen wurden bislang nur wenige Arten bzw. Arthybriden (z.B. *M. x robusta*, *M. x zumi*, *M. sieboldii*) genutzt, obwohl auch Herkünfte von *M. baccata*, *M. coronaria*, *M. florentina*, *M. hupehensis*, *M. sargentii*, *M. sikkimensis* und *M. trilobata* als hochgradig resistent beschrieben wurden (Büttner et al., 1999; Krieghoff, 1995; Ognjanov und Vujanic-Varga, 1988).

Die Genetik der in Tabelle 1 beschriebenen Mehltau-Resistenzgene wurde gezielt in *Malus*-Kreuzungsnachkommenschaften untersucht. Über mehrere Rückkreuzungsgenerationen hinweg wurde die Resistenz aus der Wildart in einen Hintergrund integriert, der nicht mehr die für Wildarten typischen, aber in Kultursorten unerwünschten negativen Eigenschaften wie z.B. Kleinfrüchtigkeit und starke Wüchsigkeit aufweist. Bislang gibt es eine zugelassene Sorte, die eine der beschriebenen Resistenzen aufweist, die Sorte 'Ariwa', die eine Kombination der *Vf*- und *PI1*-Resistenzen trägt (Kellerhals et al., 2004). Anhand der Nachkommenschaften ließ sich bei *PI1*, *PI2* und *Plw* nachweisen, dass die Resistenz nicht monogen vererbt wird, sondern dass mindestens ein weiteres Gen an der Ausprägung der Resistenz beteiligt ist (Alston, 1976; Battle und Alston, 1996; Dunemann et al., 2004). Eine mono- oder digen bedingte Resistenz lässt sich aus der Aufspaltung der Reaktionen der Nachkommen ableiten. Schwieriger bis unmöglich ist es gegenwärtig, eine mögliche zusätzliche polygene Resistenz einer Pflanze nachzuweisen, wenn diese überlagert wird durch eine starke Majorgenresistenz.

**Tabelle 1: Beschriebene Resistenzgene gegen Apfelmehltau in der Gattung *Malus***

Resistenzgen	Herkunft	Resistenz zuerst beschrieben von	Molekulare Marker entwickelt von	Position im Genom	Berichte über Resistenzbrechung
<i>PI1</i>	<i>M. x robusta</i> (MAL59/9), freie Abblüte	Knight und Alston (1968)	Markussen et al. (1995)	LG*12 Dunemann et al. (2007)	Krieghoff (1995)
<i>PI2</i>	<i>M. x zumi</i> (MAL68/8), freie Abblüte	Knight und Alston (1968)	Seglias und Gessler (1997); Dunemann et al. (1999); Gardiner et al. (1999)	LG 11 Seglias und Gessler (1997)	Lespinasse, (1983); Caffier und Laurens (2005)
<i>PId</i>	D12 (D-Serie; freie Abblüte, Abstammung unklar, vermutlich ein Wildapfel)	Visser und Verhaegh (1976)	James et al. (2004)	unteres Ende LG 12 James et al. (2004)	
<i>Plmis</i>	MIS (Mildew Immune Selection; freie Abblüte 'Starking Delicious'; vermutlich Wildart als Pollenspender)	Dayton (1977)	Gardiner et al. (2002)	LG 11 Seglias und Gessler (1997), Bus et al. (2009)	Korban und Dayton (1983)
<i>Plw</i>	'White Angel' (verwandt mit <i>M. sargentii</i> und <i>M. sieboldii</i> )	Gallot et al. (1985)	Isoenzym-Marker Battle und Alston (1996); Evans und James (2002)	oberes Ende LG 8 James und Evans (2004)	Lespinasse (1989)
<i>PI8</i>	<i>M. sargentii</i> 843	Korban und Dayton (1983)			
<i>Plsb</i>	<i>M. sieboldii</i> 722	Schuster (2000)	Dunemann (unveröffentlicht)	vermutlich LG 11	
<i>Plbj</i>	<i>M. baccata</i> 'Jackii'	Schuster (2000)	Dunemann und Schuster (2009)	Mitte LG 10	
<i>Pla</i>	Unterlage 'Aotea'	Taylor (1981)	Gardiner et al. (2004)		
<i>Pln</i>	X3191 x 'Novosibirski Sweet' freie Abblüte	Dunemann et al. (2004)	Dunemann et al. (2004)	allelisch zu <i>PI1</i> ? Dunemann et al. (2004)	

\* LG: Linkage Group/ Kopplungsgruppe

Die sogenannte „Pyramidisierung“ von Resistenzen ist das Ziel vieler Züchtungsprogramme, um ein Durchbrechen einer einzelnen Resistenz zu vermeiden (Battle und Alston, 1996; Brown, 1995; Kellerhals und Furrer, 1994). Neben der Verbesserung der Dauerhaftigkeit einzelner Resistenzen sollen durch das Pyramidisieren auch die Stärke und die Spezifität der Resistenz ausgeweitet werden, z.B. indem spezifische Resistenzen, die gegen verschiedene Rassen wirksam sind, in einer Pflanze vereint werden.

Aus Tabelle 1 wird ersichtlich, dass bei vier der beschriebenen Resistenzen über eine mögliche Brechung der Resistenz berichtet wurde, d.h. dass bereits virulente Rassen des Mehltau auftraten. Caffier und Laurens (2005) stellten fest, dass verschiedene *PI2*-Nachkommenschaften im Versuchsanbau bereits nach sechs Jahren Standdauer der Anlage deutlichen Mehltaubefall zeigten und auch in Neuseeland wurde eine Durchbrechung von *PI2* im Feld beobachtet (V. Bus, persönliche Mitteilung).

Eine Inokulation mit definierten Rassen eines Pathogens kann Aussagen über die vorhandenen Resistenzgene zulassen. Diese Möglichkeit besteht für den Apelmehltau nicht, denn bislang gibt es kein „Rassensortiment“, das für gezielte Pflanzentestungen verfügbar wäre. Dies ist bedingt durch die obligat biotrophe Lebensweise des Erregers, die eine Isolation und Erhaltung von Einsporisolen sehr aufwendig macht (Dayton, 1977). Daher kann in Testungen meist nur das lokal vorhandene Rassenspektrum verwendet werden.

Während Apfelsämlinge bereits in der Saatkiste auf ihre Anfälligkeit gegenüber dem Apfelschorf getestet werden können, ist diese Art der Frühselektion gegenüber dem Mehltau fraglich (Blazek, 2004). Mihatsch und Mildenerger (1967) zeigten, dass es keine Korrelation zwischen Anfälligkeit innerhalb der ersten drei Jahre und Anfälligkeit im adulten Stadium gibt, Sämlinge sind in der Regel anfälliger als die adulten Pflanzen (Janse et al, 1994). Ob eine Selektion der adulten Pflanzen im Freiland oder im Gewächshaus durchgeführt werden sollte, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Lespinasse et al. (1976), Dayton (1977) und Schuster (2000) fanden eine gute Korrelation zwischen Freiland- und Gewächshausergebnissen und befürworteten eine Gewächshausprüfung, da im Freiland Klimafaktoren und Inokulum von Jahr zu Jahr stark variieren. Andere Autoren konnten keine Korrelation zwischen den Ergebnissen finden, es trat im Gewächshaus generell mehr Befall auf als im Freiland (Blazek, 2004; Jeger et al., 1986).

Aufgrund dieser Problematik kann die Molekulargenetik dem Züchter eine große Hilfestellung bieten, indem molekulare Marker für die einzelnen Resistenzen entwickelt werden. Mit diesen können bereits im Sämlingsalter Pflanzen ausgewählt werden, die Kombinationen von mehreren Resistenzgenen tragen (Battle und Alston, 1996; Evans und James, 2002; Stankiewicz und Pitera, 2002; Stankiewicz-Kosyl und Pitera, 2005). Zusätzlich kann eine solche markergestützte Selektion in sehr frühen Stadien des Züchtungsprozesses Kosten

einsparen helfen, da unnötige Vermehrung und Pflege von Pflanzen, die die erwünschten Eigenschaften nicht ausprägen, reduziert werden (Frey et al., 2004). Solche molekularen Marker sind für fast alle beschriebenen Mehlttauresistenzen vorhanden oder in Entwicklung (Tabelle 1).

Die Mehlttauresistenzen, die in kultivierten Apfelsorten (im Gegensatz zu Wildarten) auftreten, sind häufig polygen bedingt (Alston, 1976; Knight und Alston, 1968; Lespinasse et al., 1976; Stankiewicz et al., 2001). So gelten z.B. die Sorten 'Discovery' und 'Dülmener Rosenapfel' als wenig anfällig (Jeger und Butt, 1986) und starke QTL (Quantitative Trait Loci) -Effekte deuten auf Resistenzfaktoren auf verschiedenen Kopplungsgruppen hin (Thiermann et al., 2002; Calenge und Durel, 2006). Um einen besseren Schutz vor Pathogenen zu bieten wird in der Züchtung daran gearbeitet, Majorgene, die häufig vollständige Resistenz der Pflanzen bewirken, in einen polygenen Resistenzhintergrund zu integrieren (Alston, 1976; James et al., 2004). Treten neue Rassen des Pathogens auf, gegen die die monogene Resistenz wirkungslos ist, sind die Pflanzen zumindest teilweise geschützt. Der Selektionsdruck auf das Pathogen, der bei monogen bedingter Resistenz erhöht ist, wird durch die vorhandene polygene Resistenz abgemildert und macht die monogene Resistenz dadurch dauerhafter (Caffier und Laurens, 2005; Evans und James, 2002; James et al., 2004). Jedoch ist die Züchtungsarbeit mit polygenen Resistenzen nicht ganz einfach, da mit jedem Kreuzungsschritt einige Gene bzw. Allele, die zur Resistenz beitragen, verloren gehen.

Die Kartierung von verschiedenen Resistenzgenen sowohl gegen den Apfelmehltau als auch gegen Schorf hat gezeigt, dass sie häufig gekoppelt vorliegen oder im Extremfall sogar ein Resistenzgencluster bilden (Gardiner et al., 2007). So liegt *PI1* in der selben Region am distalen Ende von Kopplungsgruppe 12, in der auch *Pld* und die Schorffresistenzgene *Vg* und *Vb* liegen (Dunemann et al., 2007). *Plmis* wurde in der selben Region von Kopplungsgruppe 11 lokalisiert, wie *PI2* (Bus et al., 2010). Zudem liegen viele QTLs auch in den gleichen Regionen wie Majorgene, was vermuten lässt, dass diese QTLs möglicherweise übriggebliebene Resistenzgenbereiche (residual resistance) von überwundenen Resistenzgenen darstellen (Pedersen und Leath, 1988). Es hat sich beim Schorf auch gezeigt, dass manche der aufgefundenen QTLs isolat-spezifisch sind und eine Gen-für-Gen-Beziehung mit dem Pathogen eingehen. Daher können sie ebenso vom Zusammenbruch bedroht sein, wie die Resistenz von Majorgenen (Gardiner et al., 2007). Die Kartierung von Resistenzgenen gegen den Apfelmehltau ist weitaus aufwendiger als die Kartierung von Schorffresistenzen, da die Phänotypisierung der Sämlingsgenotypen schwierig ist, die Ausprägung der Resistenz wird stark von den Umweltfaktoren beeinflusst. Zudem stimmen die juvenile und adulte Resistenz der Pflanzen zumeist nicht überein und die bereits adulten

Pflanzen müssen mehrere Jahre beobachtet werden, um verlässliche Aussagen über die Resistenz des adulten Phänotypes zu erhalten.

Über die Wirkungsweise der beschriebenen Resistenzgene ist bislang wenig bekannt und es ist auch noch kein isoliertes Resistenzgen publiziert. Es wird davon ausgegangen, dass die Ausprägung der einzelnen Resistenzgene auf mehreren Teileigenschaften beruht und dass sich die verschiedenen Resistenzen in ihrer Stärke unterscheiden (Schander, 2005). So zeigten *Pld* und *Plw* in Testungen eine stärkere Wirkung als *PI1* und *PI2* (Evans und James, 2002). Manche *PI1*-Träger reagieren mit Nekrosen als hypersensitive Reaktion auf den Angriff des Mehltaus (Alston, 1976; Evans und James, 2002). Eine Reihe von Studien untersuchte die Zusammenhänge zwischen der Morphologie der Blätter oder Blattoberflächen und von Zellinhaltsstoffen mit der Resistenz, aber keine dieser Studien kam zu einem eindeutigen Ergebnis (Cimanowski, 1970; Schander, 2005). Allgemein ist beim Apfel bekannt, dass selbst in anfälligen Sorten eine ontogenetische Resistenz vorhanden ist, d. h., dass die Blätter mit zunehmendem Alter nicht mehr infiziert werden können (Lalancette und Hickey, 1985). Als Zeitpunkt für das Auftreten dieser altersbedingten Resistenz wird der Farbumschlag vom helleren zum dunkleren Grün angegeben, wenn sich die Blätter nach der Entfaltung zu vergrößern beginnen (Schander, 2005). Kriehoff (1995) beobachtete die Ausbildung der Altersresistenz auch *in vitro*. Zudem wurde beobachtet, dass die Altersresistenz auch bereits etablierte Kolonien des Erregers im Wachstum hinderte und dass die Assimilation bei jüngeren Blättern deutlicher reduziert wurde als bei älteren (Ellis und Ferree, 1981). Es ist nicht bekannt, wodurch diese Resistenz bedingt ist. Es wird vermutet, dass die Ausbildung des Abschlussgewebes, bestehend aus Kutikula und Epidermis entscheidend ist, denn Berwith (1936) konnte die Altersresistenz durch Abrasivbehandlung überbrücken.

### **2.3 Rassenbildung bei pilzlichen Pathogenen**

Innerhalb einer Spezies eines Pflanzenpathogens lassen sich hinsichtlich der Interaktion mit der Wirtspflanze meist weitere Unterteilungen vornehmen. Beim Getreidemehltau *Blumeria graminis* unterscheidet man je nach Wirt z. B. die verschiedenen *formae speciales* (f.sp.) *hordei* und *tritici*, die jeweils nur auf Gerste oder Weizen vorkommen. Zusätzlich lässt sich auch innerhalb dieser Varietäten eine weitere Unterteilung treffen. Diese Untereinheiten einer Spezies, die durch ein unterschiedliches Infektionsvermögen auf verschiedenen Genotypen des Wirtes gekennzeichnet sind, werden als physiologische Rassen oder Pathotypen bezeichnet (Hoffmann et al., 1994). Die einzelnen Rassen lassen sich nicht morphologisch oder in anderen phänotypischen Eigenschaften unterscheiden. Eine Unterscheidung ist lediglich im Biotest auf der Wirtspflanze möglich. Das Auftreten

verschiedener Pathotypen wird durch die Gen-für-Gen-Hypothese von Flor (1942) erklärt, der zufolge die Zusammensetzung der Virulenzen in einer Pathogenpopulation abhängig von der Diversität der Resistenzgene im Wirt ist. Dabei steht jedem Resistenzgen auf der Pflanzenseite ein entsprechendes Avirulenzgen auf der Pathogenseite gegenüber.

Die Bestimmung von Rassen einer Spezies wird durch Tests von Isolaten des Erregers mit einem Sortiment geeigneter Wirtspflanzen (Differentialsortiment) durchgeführt. Dabei ist das Rassenspektrum, das ermittelt werden kann, abhängig von der Verschiedenartigkeit und dem Umfang des Testsortimentes. Theoretisch lassen sich mit  $n$  Differentialwirten  $2^n$  mögliche Rassen unterscheiden. Bei *Puccinia graminis* var. *tritici* wurden z. B. mehr als 200 physiologische Rassen festgestellt (Hoffmann et al., 1994). 510 Isolate von *Blumeria graminis* var. *hordei* konnten mithilfe von elf Differentialwirten in 86 Pathotypen eingeteilt werden (Andrivon und de Vallavieille-Pope, 1993). Bei *Podosphaera pannosa*, dem Mehltau der Rose, wurden mithilfe von zehn Rosengenotypen acht Isolate in acht Rassen eingeteilt. Dabei stammten fünf Rassen von dem selben Ort, einer Forschungseinrichtung für Zierpflanzenzüchtung, mit vielen Wildrosen und verschiedensten Resistenzen darin im Bestand (Linde und Debener, 2003). Hohe Rassendiversität wurde auch beim Echten Mehltau (*Erysiphe fischeri*) von *Senecio vulgare* beobachtet, dort konnten 24 Isolate auf 50 Greiskraut-Linien in verschiedene Virulenzphänotypen eingeteilt werden (Bevan et al., 1993). Bei anderen Echten Mehltaupilzen wurden bislang weit weniger Rassen beschrieben, z. B. wurden acht Rassen von *Sphaerotheca fuliginea* auf Arten innerhalb der Familie der *Cucurbitaceae* in den USA, Afrika, Europa und dem angrenzenden Mittelmeerraum beschrieben, zusätzlich vier weitere in Japan (Cohen et al., 2004). Bei Testungen von 41 Isolaten von *Erysiphe cichoracearum* wurden lediglich zwei verschiedene Rassen festgestellt (Bardin et al., 1999).

Der Nachweis von physiologischen Rassen oder Pathotypen des Apfelmehltaus wurde erstmals von Kriehoff (1995) erbracht, eine Bestätigung dieser Befunde erfolgte durch die Arbeiten von Urbanietz und Dunemann (2005). Kriehoff (1995) gelang es, sechs Isolate auf fünf Genotypen in vier Rassen einzuteilen. In der Arbeit von Urbanietz und Dunemann (2005) wurden fünf Isolate aus fünf verschiedenen Ländern Europas in Kombination mit 36 *Malus*-Genotypen getestet, wobei sieben *Malus*-Genotypen benötigt wurden, um die fünf Isolate klar zu differenzieren.

Schon vor diesen Arbeiten wurde eine Rassenbildung des Apfelmehltaus vielfach vermutet. Bereits 1985 berichteten Gallot et al. von Beobachtungen an einer Pflanze aus einer resistenten Nachkommenschaft von *M. x robusta* 'Korea'. Im Jahr 1983 wurde an einer einzelnen Pflanze der Nachkommenschaft an einem einzelnen Blattbüschel von insgesamt 31 Trieben Befall beobachtet. Im folgenden Jahr zeigte sich aber an keinem Trieb eine Infektion mit Mehltau. Gallot et al. (1985) diskutierten diese Beobachtung und vermuteten,

dass möglicherweise eine neue Rasse auftrat, die befähigt war, die Resistenz aus *M. x robusta* 'Korea' zu überwinden. Dies würde ein Vorhandensein von Rassen bestätigen. Ein anderer Erklärungsansatz ist, dass das Pathogen besonders günstige Bedingungen vorgefunden haben könnte, die es zur Infektion befähigt haben. Ähnliche Beobachtungen wurden von Korban und Dayton (1983) beschrieben.

Hierin wird die Problematik einer Rassenbestimmung ersichtlich. Entscheidend ist, dass die Identifizierung der Rassen unter gleichen Umweltbedingungen stattfindet, was eine Übertragbarkeit der Tests in andere Labore erschwert. Neben der Rasse des Erregers wird die Pflanzenreaktion stark durch Umweltfaktoren wie Lichtintensität, Temperatur, Feuchte, Alter und Ernährungszustand der Pflanze beeinflusst (Cohen et al., 2004; Linde und Debener, 2003). Die gleichen Faktoren beeinflussen damit auch die Genauigkeit und Verlässlichkeit einer Rassenidentifikation (Cohen et al., 2004). Zusätzlich können auch die Inokulationsbedingungen, wie z. B. die Konidiendichte, entscheidend sein (Linde und Debener, 2003). Meist werden die Testungen auf isolierten Blättern oder Blattscheiben und unter standardisierten Laborbedingungen durchgeführt (Bardin et al., 1997; Bardin et al., 1999; Delye und Corio-Costet, 2005; Linde und Debener, 2003; Olmstead und Lang, 2000; Urbanietz und Dunemann, 2005).

Um Erregerrassen unabhängig von aufwendigen Biotests verlässlich bestimmen zu können, wird vielfach daran gearbeitet, eine Unterscheidung auf molekularer Ebene mithilfe von genomischen Markern durchzuführen (Hoffmann et al., 1994). Bislang war es jedoch bei verschiedenen Mehltaupilzen nicht möglich, eine Kopplung zwischen einem Virulenzgen und einem Marker aufzudecken (Bardin et al., 1997; Bardin et al., 1999; Brown und Simpson, 1994; Cohen et al., 2004). Neben der obligat biotrophen Natur der Mehltaupilze, die eine Kultivierung und Erhaltung von Isolaten erschwert, kommt hinzu, dass, mit Ausnahme der Getreidemehltau-Pilze, die Sammlung an ausreichendem pilzlichen Material für molekulargenetische Arbeiten sehr aufwändig ist, da die Pilze in der Regel nur in geringem Umfang sporulieren (Delye et al., 1995). Daher wurden in molekularen Arbeiten zumeist die RAPD-Technik (Random Amplified Polymorphic DNA) und Analysen der ribosomalen ITS- und 5.8S-DNA (Internal Transcribed Spacer) durchgeführt, die nur relativ wenig DNA erfordern (Bardin et al., 1997; Bardin et al., 1999; Cohen et al., 2004; Delye et al., 1995; Delye und Corio-Costet, 2005; McDermott et al., 1994). Andere Markertechniken, wie z. B. AFLP oder die Entwicklung von Mikrosatellitenmarkern, wurden selten bis gar nicht angewendet, obwohl diese Techniken viele Vorteile bieten.

Ein direkter Nutzen der Rassenidentifizierung ist in der Regel nicht für den Anbauer zu sehen, sondern eher für den Züchter oder Saatgutproduzenten und die Grundlagenforschung (Cohen et al., 2004). Bei einjährigen Kulturen ist es fraglich, ob die Sortenwahl bei Kenntnis der Erregerrassen durch diese beeinflusst erfolgen sollte. Je nach

Pathogene können sehr schnelle Verschiebungen in den Populationen der Pathogene in geographischen Regionen oder auch nur in einem einzelnen Gewächshaus stattfinden, teilweise innerhalb einer einzigen Saison (Cohen et al., 2004; del Pino et al., 2002), und eine Entwicklung lässt sich schwerlich vorhersagen. Zumeist wird eine Koexistenz mehrerer Rassen beobachtet (del Pino et al., 2002). Bei langjährigen Kulturen wie dem Apfel kann die Auswahl einer Sorte nicht anhand des lokal vorhandenen Rassenspektrums erfolgen. Für den Züchter ist es jedoch wichtig zu wissen, welche Rassen der Pathogene im eigenen Zuchtgarten vorhanden sind, und welche Rassen in Anbauregionen, die potentielle "Kunden" darstellen, vorkommen. Teilweise kann eine Ausbreitung von einzelnen Rassen sehr genau verfolgt werden. Die Rassen 6 und 7 des Apfelschorfes *Venturia inaequalis* sind beispielsweise befähigt, die meisten der Genotypen, die das Vf-Gen tragen, zu infizieren. Das Auftreten dieser Rasse wurde zuerst in Deutschland beobachtet (Parisi et al., 1993). Mittlerweile wurde Rasse 6 in verschiedenen Ländern aufgefunden, hauptsächlich in Ländern Nordeuropas (Schweden, Dänemark, Niederlande, Nord-Frankreich) (Parisi et al., 2004). Da beim Apfelmehltau bislang auf der Pathogenseite noch zuwenig Kenntnisse über ein Auftreten verschiedener Rassen bekannt ist und Genotypen, die die bekannten Resistenzgene tragen nicht in großem Umfang angebaut werden, kann über die Situation hier nur wenig gesagt werden.

## **2.4 Fungizidresistenz bei Pflanzenpathogenen**

### **2.4.1 Hintergrund**

Die im kommerziellen Kernobstanbau in Europa eingesetzten Pflanzenschutzmittel dienen zum Großteil der Behandlung von pilzlichen Erkrankungen. Dabei sind Schorf (*Venturia inaequalis* Cooke) und Mehltau (*Podosphaera leucotricha* (Eil. et Ev.) Salm.) die bedeutendsten pilzlichen Schaderreger am Apfel (*Malus x domestica* Borkh.). Sie verursachen Jahr für Jahr große Schäden, bei starkem Befall mit Mehltau wird von Ertragsverlusten bis zu 40% berichtet (Friedrich und Rode, 1996). Im Durchschnitt werden bis zu 20 Behandlungen durchgeführt (Roßberg, 2003), wobei in den meisten Anbauregionen hauptsächlich der Apfelschorf *Venturia inaequalis* bekämpft wird. In Sachsen wurden in den letzten Jahren gegen Schorf durchschnittlich 11 Behandlungen durchgeführt, gegen Mehltau allein lediglich durchschnittlich 0,5 Behandlungen pro Saison, und nicht in allen Jahren (Report der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft, 2002). Viele der gegen *Venturia* eingesetzten Mittel sind auch gegen den Apfelmehltau wirksam, so dass eine Bekämpfung gegen Mehltau allein meist nicht notwendig war. Seit den 1990er Jahren werden in geringem Umfang auch Apfelsorten angebaut, die weniger anfällig gegenüber dem

Apfelschorf sind, da sie das Vf-Gen für Schorfresistenz tragen. Der dadurch reduzierte Aufwand an Fungiziden führte bereits dazu, dass der Apfelmehltau (und andere Pathogene) zunehmend als eigenständiges Problem auftrat (Gessler et al., 2000; Koller et al., 1995).

Im Zuge der Anpassung des Pflanzenschutzgesetzes an EU-Recht hat sich die Anzahl der im Kernobstanbau zugelassenen Fungizide stark reduziert, mit weiterhin abnehmender Tendenz (Landsmann et al., 1998). In 2010 stehen für die Bekämpfung des Apfelmehltaus in Deutschland nur noch 21 Mittel mit 6 Wirkstoffen zu Verfügung, für den Apfelschorf immerhin noch 40 Mittel mit insgesamt 15 Wirkstoffen (Stand April 2010; <https://portal.bvl.bund.de>). Daneben hat sich u.a. in Studien aus Großbritannien und Beobachtungen in Sachsen und in Ungarn ein zusätzliches Problem in der Bekämpfung des Mehltau gezeigt. Nach vermehrter Anwendung haben sich anscheinend bereits Mehлтаustämme entwickelt, die eine reduzierte Sensitivität gegenüber den eingesetzten Fungizidwirkstoffen aufweisen (Appel und Felsenstein (2000); Trapp und Kriehoff, Dresden; Kiss, Budapest, Ungarn (persönliche Mitteilungen)) Dieser Wirkungsverlust kann zu einer weiteren Reduktion der einsetzbaren Mittel führen. In Großbritannien wurde ein Nachlassen der hauptsächlich angewendeten Mittel der DMI-Fungizid-Gruppe (Demethylase-Inhibitoren) beobachtet. Zusätzlich zu dieser Wirkstoffklasse wurde in Sachsen und Ungarn ein Nachlassen der Wirkung von Strobilurin-Fungiziden beobachtet.

Für beide Wirkstoffgruppen gibt es zahlreiche Beispiele für resistente Stämme von unterschiedlichen Pathogenen (FRAC, Fungicide Resistance Action Committee; [www.frac.info](http://www.frac.info)). Im Kernobstanbau wurde jedoch bislang in erster Linie von Resistenzen in *Venturia*-Stämmen berichtet. Viele Wirkstoffgruppen waren schon bald nach Einführung der Mittel von Resistenzbildung betroffen, so auch MBCs (Methyl Benzimidazole Carbamate), Dodine und DMIs, aber auch von Resistenz gegenüber den erst 1996 im Kernobstanbau zugelassenen Strobilurinen wurde berichtet ([www.frac.info](http://www.frac.info), (Köller et al., 2004)). Bereits am Beispiel des Benomyl aus der Gruppe der Benzimidazole hat sich gezeigt, dass intensiver, einseitiger Gebrauch eines Wirkstoffes zunehmend zu Pathogenstämmen (in diesem Fall Geurkenmehltau) mit reduzierter Sensitivität geführt hat (McGrath, 2001). Dabei überleben die meisten resistenten Stämme einige Jahre und weitere Applikationen derselben Wirkstoffklasse fördern die Vermehrung dieser resistenten Populationen (Reuveni, 2000).

Resistente Pflanzenpathogenpopulationen können sich ausgehend von natürlich vorkommenden resistenten Individuen entwickeln. Diese können beispielsweise durch rekurrente Mutation entstehen, die zur Resistenz führt, und treten zunächst in geringer Häufigkeit auf (Gisi et al., 2000). Die Häufigkeit von resistenten Individuen steigt im Laufe der Zeit (während einer Saison oder von Jahr zu Jahr) an und resultiert in einer resistenten Teilpopulation, verursacht durch den Selektionsdruck von Fungizidanwendungen und durch Migration von Individuen. Deutlich sichtbares Zeichen der Resistenzentwicklung ist die

Reduktion der Krankheitskontrolle, verglichen mit früheren Resultaten und mit Produkten einer anderen Wirkstoffklasse. Wie ernst zu nehmen auch zunächst kleine resistente Teilpopulationen sein können, wurde im Falle von *Septoria tritici* berichtet. Ein Resistenzlevel von nur 0.02% resistenten Individuen reichte aus, um einen Wirkstoff als Pflanzenschutzmittel wertlos zu machen (Doyle, 2004).

#### **2.4.2 Quantitative und qualitative Fungizidresistenz**

In Pathogenpopulationen können zwei verschiedene Formen der Adaptation oder Resistenzentwicklung gegenüber fungiziden Wirkstoffen auftreten. Diese werden als quantitative und qualitative Resistenz bezeichnet. Die quantitative Resistenz (auch Multi- oder Oligo-Step-Resistenz) stellt einen kontinuierlichen Prozess der Resistenzentwicklung dar (Felsenstein und Jaser, 2000). Dieser Prozess wird auch als „Shifting“ bezeichnet, die gesamte Population verändert sich hin zu einer weniger sensitiven Population (Doyle, 2004). Das Pathogen kann sich schrittweise, durch Anhäufung verschiedener genetischer Modifikationen anpassen. Dabei bleiben die ersten Adaptationen im Feld meist unbemerkt, die Reduktion der Sensitivität führt zunächst nicht automatisch zu einem feststellbaren Verlust an Wirksamkeit des betreffenden Wirkstoffes im Feld. Diese Art der Resistenz tritt im Allgemeinen bei „Multisite“-Fungiziden auf, also bei Mitteln, die an verschiedenen Stellen in den Metabolismus des Pathogens eingreifen (z. B. Dithiocarbamate, Phthalimide, Sulphamide). Diese werden in der Regel durch unterschiedliche Gene gesteuert (Gallian et al., 2005; Köller et al., 2004). Eine verminderte Sensitivität tritt häufiger auf als absolute Resistenz (Doyle, 2004). Mechanismen, die eine quantitative Resistenz bedingen können, sind vielfältig. Es wurden z. B. ABC-Transporter (Efflux-Pumpen der "ATP binding cassette") beschrieben, die aktiv eine Absenkung der Konzentration xenobiotischer Substanzen in der Zelle ermöglichen (Kuck und Mehl, 2003). Durch Aktivieren alternativer Stoffwechselvorgänge können blockierte Reaktionsschritte umgangen werden (z. B. AOX (Alternative Oxidase), siehe unten). Fungizide können enzymatisch modifiziert oder Proteine verstärkt exprimiert werden (Horbach et al., 2004). Das Ausbringen höherer Konzentrationen und häufigere Applikation kann die Wirkung der Mittel oftmals zunächst noch erhalten, aber dauerhafter Gebrauch kann zu völligem Verlust der Wirksamkeit führen (Köller et al., 2004). Dabei beschleunigt eine verminderte Ausbringungsrate, wie sie in der Praxis häufig angewendet wird (halbe Aufwandmenge, (Morzfeld et al., 2004)), die Selektion, denn die überlebenden Isolate einer unzureichenden Fungizidbehandlung sind der Ursprung der nächsten Generation an Pathogenen.

Dagegen ist die qualitative Resistenz von Beginn an auch gegenüber sehr hohen Dosen der Wirkstoffe wirksam und bedeutet oft einen völligen Verlust der Kontrolle (Gallian et al., 2005). Mutationsbedingte Resistenzfaktoren stellen teilweise eine mehrere hundert- bis

tausendfache Steigerung gegenüber dem Wildtyp dar (Chin et al., 2001). Qualitative Resistenz wird als disruptiv beschrieben, die Pathogene sind entweder sensitiv oder resistent, eine Abstufung tritt nicht auf. Die Resistenz wird oftmals durch eine einzelne genetische Mutation bedingt (Felsenstein und Jaser, 2000). Sie tritt häufig gegenüber Single-Site-Fungiziden auf, wie z. B. DMIs oder Strobilurinen, also gegenüber Wirkstoffen, die an einem einzigen Punkt im Stoffwechsel des Pathogens angreifen (Gallian et al., 2005). Diese Art der Resistenz kann sich sehr schnell entwickeln, bei *B. graminis* f.sp. *tritici* wurde eine Resistenz bereits zwei Jahre nach Einführung der Strobilurine beobachtet (Chin et al., 2000; Kuck und Mehl, 2003), beim Gurkenmehltau *Sphaerotheca fuliginea* traten resistente Isolate bereits nach ein bzw. zwei Anwendungen im Gewächshaus auf (Ishii et al., 2001).

### 2.4.3 Strobilurin-Fungizide

Die Klasse der Strobilurin-Fungizide geht auf die natürlich vorkommenden antifungalen Stoffwechselprodukte Antimycin A aus *Oudemansiella mucida* und Strobilurin A aus *Strobilurus tenacellus* zurück. Diese holzzersetzenden Basidiomyceten produzieren die fungiziden Stoffe, um mögliche Konkurrenten auszuschalten (Ishii et al., 2001; Ziegler et al., 2003). Basierend auf diesen Stoffen wurde die Klasse der synthetischen Strobilurine entwickelt, die mittlerweile für verschiedenste Kulturen und Anwendungen Zulassung gefunden hat (Avila-Adame et al., 2003). Zu den Wirkstoffen gehören u. a. Trifloxystrobin (Handelsname Flint, Bayer) und Kresoxim-Methyl (Discus, BASF). Beide sind im Kernobstanbau zugelassen. Strobilurine greifen in die Energiegewinnung der Zelle in den Mitochondrien ein. Sie binden an das Zentrum der Qo (Quinone outside) site des Cytochrom *b*, hemmen dadurch die Atmung und blockieren die Energiegewinnung (Avila-Adame et al., 2003; Miller und Gubler, 2004). Strobilurine und einige chemisch nicht verwandte Stoffe werden der Gruppe der Qols (Qo Inhibitors) zugeordnet. Sie zeigen die größte Wirkung auf frühe Stadien der pilzlichen Entwicklung, die viel Energie benötigen, wie z. B. die Sporenkeimung und Infektion, und bieten den Pflanzen in erster Linie einen präventiven Schutz (Bartlett et al., 2002; Chin et al., 2001). Gegen einige Krankheiten wird allerdings auch kurative Aktivität verzeichnet. Sie sind gegen alle Hauptgruppen der Pilze wirksam (Bartlett et al., 2002).

Die Bildung von Resistenzen gegenüber Qols wurde bereits vor der Zulassung der ersten Mittel erwartet, da bei *Saccharomyces cerevisiae* und anderen Organismen resistente Individuen auftraten (Avila-Adame et al., 2003). Auch Labormutanten von *Magnaporthe grisea* und *V. inaequalis* zeigten hohe Resistenzlevel gegenüber Qols. Zwischen den verschiedenen Vertretern der Qols tritt Kreuzresistenz auf (Avila-Adame et al., 2003; Chin et al., 2000; Ishii et al., 2001; Küng Färber et al., 2002; Steinfeld et al., 2001).

Zwei verschiedene Mechanismen der Resistenzbildung gegenüber Qols sind für verschiedene Pflanzenpathogene beschrieben: quantitative Resistenz, bedingt durch Aktivität der Alternativen Oxidase (AOX) und qualitative, mutationsbedingte Resistenz im Cytochrom *b*-Gen (Cyt *b*). Die Aktivierung eines alternativen Oxidationsprozesses zur Energiegewinnung (AOX) wurde bei Pflanzenpathogenen nur in Abwesenheit des Wirtes beschrieben (Steinfeld et al., 2001; Wood und Hollomon, 2003). Daher ist sie für den Apfelmehltau als obligaten Parasiten nicht relevant und soll hier nicht näher erläutert werden. Der zweite Resistenzmechanismus, der weitaus ausführlicher untersucht wurde, ist das Auftreten von Mutationen im Bereich der Angriffsstelle (target site) der Qols, im Cytochrom *b*-Gen. Das Cytochrom *b*-Gen wurde für verschiedene Organismen vollständig sequenziert und es bestehen z. T. erhebliche Größenunterschiede. So ist es bei *V. inaequalis* 10.656 bp groß und beinhaltet sieben Exons und sechs Introns, bei *B. graminis* f.sp. *tritici* umfasst es dagegen nur 1.140 bp und weist keinerlei Introns auf (Gisi et al., 2000). Sequenzvergleiche sensitiver und resistenter Isolate verschiedener Pathogene zeigen, dass es elf mögliche Mutationen an zwei verschiedenen Stellen im Cytochrom *b*-Gen gibt, die zu einer reduzierten Qol-Sensitivität führen können (Fraaje et al., 2002; Kuck und Mehl, 2003; Sierotzki et al., 2005). Daneben sind, je nach Pathogen teilweise in sehr unterschiedlicher Anzahl, weitere Sequenzunterschiede beschrieben worden, die aber keinen Einfluss auf die Reaktion gegenüber Qols haben (Avila-Adame et al., 2003; Ishii et al., 2001; Kim et al., 2003; Robinson et al., 2002). Die bedeutendste der zur Resistenz führenden möglichen Mutationen bewirkt einen Wechsel der Aminosäure an der Position 143 von Glycin zu Alanin (die sogenannte G143A- Mutation). Diese Mutation wurde für zahlreiche Pathogene dokumentiert, z. B. für *B. graminis* f.sp. *tritici* an Weizen, *S. fuliginea* und *Pseudoperonospora cubensis* an Gurke, *Plasmopara viticola* an Wein, *Mycosphaerella fijiensis* (Black Sigatoka) an Banane, *M. grisea* an Reis und *V. inaequalis* an Apfel (Avila-Adame et al., 2003). Eine weitere, häufig in Verbindung mit Resistenz gegen Qols auftretende Mutation ist die F129L-Mutation, die zu einem Wechsel der Aminosäure Phenylalanin zu Leucin an Position 129 führt. Diese wurde z. B. für Feldisolate von *M. grisea*, *Pythium aphanidermatum*, *Alternaria solani* und für *S. cerevisiae* beschrieben (Avila-Adame et al., 2003). Die beiden Mutationen unterscheiden sich in ihrer Wirkung sehr deutlich. Während G143A zu 1000- bis 1300-fach höheren EC 50 (Effective Concentration) - Werten bei *Pyricularia grisea* führt, bewirkte F129L bei Azoxystrobin nur eine 140-fach höhere EC50, bei Trifloxystrobin sogar nur eine 30-fach höhere EC50 (Kim et al., 2003). Zudem wurde von einer weiteren, seltenen Mutation in *Pyrenophora tritici-repentis* an Aminosäureposition 137 (Glycin zu Arginin) berichtet, die zu einer mit der F129L vergleichbaren Resistenz führt (G137R) (Sierotzki et al., 2007).

Der Nachweis, dass tatsächlich die G143A-Mutation verantwortlich für den hohen Resistenzgrad ist, wurde erbracht, indem sensitive Formen von *M. fijiensis* und *S. cerevisiae* mit dem *Cytochrom b*-Gen von resistenten Individuen transformiert wurden (Fisher et al., 2004; Gisi et al., 2002). In beiden Fällen bewirkte die integrierte Mutation Resistenz gegenüber Qols. Bei *S. cerevisiae* wurden zusätzlich verschiedene Herkünfte des Gens untersucht und es zeigte sich, dass die Mutation je nach Hintergrund, dem sie entnommen wurde, unterschiedliche Auswirkung auf die Fitness der Transformanten hatte (Fisher et al., 2004).

Das Entstehen dieser Resistenz bewirkenden Mutationen wird durch die generell höhere Mutationsrate in den Mitochondrien begründet, die, verglichen mit dem Kerngenom, etwa das Zehnfache beträgt (Gisi et al., 2002; Ishii et al., 2001). Die Vererbung der Strobilurinresistenz an die folgenden Generationen und damit die Ausbreitung innerhalb einer Population wurde mehrfach untersucht (Gisi et al., 2000; Gisi et al., 2002; Robinson et al., 2002). Bei den meisten Pathogentypen werden die Mitochondrien bei der sexuellen Vermehrung uniparental, und zwar meist von der mütterlichen Seite weitergegeben, wobei in vielen Fällen jeder der Partner den mütterlichen Elternteil darstellen kann (hermaphroditische Vererbung) (Gisi et al., 2002). Da der Apfelmehltau sich in erster Linie asexuell fortpflanzt, ist die Vererbung bei der sexuellen Reproduktion hier vermutlich weniger interessant. Entscheidender ist die Frage, wie sich die Mutation eines einzelnen Mitochondriums auswirkt. Zellen enthalten gewöhnlich hunderte von Mitochondrien mit eigenen Genomen (Fraaje et al., 2002). Daher geht man davon aus, dass es einen heteroplasmatischen Zwischenzustand zwischen dem sensitiven Wildtyp und den resistenten Mutanten gibt (Bäumler et al., 2003b; Fraaje et al., 2002; Gisi et al., 2002; Robinson et al., 2002; Zheng et al., 2000). Unter dem Selektionsdruck der Qols sollte die geringe Kopienzahl der "resistenten" *Cytochrom b*-Sequenzen in einem einzelnen Individuum zunehmen (Bäumler et al., 2003b). Man geht von einer intrazellulären Vermehrung der Mitochondrien im heteroplasmatischen Zustand und von einer Zell-zu-Zell-Weitergabe von mutierten Mitochondrien bei der Mitose aus (Gisi et al., 2002). In *B. graminis* f.sp. *tritici* konnten gemischte Allelpopulationen molekular nachgewiesen werden. Dabei war es möglich, resistente A143-Allele unter strobilurinsensitiven mit einer Häufigkeit von 1 in 10.000 zu detektieren. Die Wirksamkeit der mutierten Allele auf die Resistenz in einem heteroplasmatischen Zustand wurde für *P. viticola* beschrieben. Eine Häufigkeit von 2% des A143 war ausreichend, um phänotypisch die Qol-Resistenz auszuprägen (Köller et al., 2004). Die meisten der getesteten Isolate waren jedoch homoplasmatisch entweder für A143 oder für G143 (Fraaje et al., 2002). Wie dauerhaft die unterschiedlichen Zustände sind, wurde für *Blumeria* und *Venturia* untersucht. Es zeigte sich, dass die Strobilurinresistenz in manchen der *Blumeria*-Isolate nicht stabil war, wenn sie lange Zeit (30 Generationen) ohne

weitere Selektion vermehrt wurden (Fraaje et al., 2002). Auch *Venturia*-Zellen mit heteroplasmatischem Zustand haben sich ohne den Selektionsdruck von Fungiziden schnell (nach bereits vier Generationen) wieder in einen homoplasmatischen Zustand umgewandelt (Zheng et al., 2000). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das mutierte A143-Allel einen Fitnessnachteil bietet, auch wenn dieser bislang nicht nachweisbar war (Fraaje et al., 2002). Der Nachweis der Punktmutationen oder SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) im Cytochrom *b* kann mittels verschiedener Techniken erfolgen. PCR-Fragmente, die die Region um die erwartete Mutation enthalten, wurden sequenziert, teilweise erfolgte die Sequenzbestimmung mittels Pyrosequencing-Technik (Benting et al., 2004; Schwarz et al., 2004). Da die Punktmutationen G143A und F129L zum Verlust oder Gewinn einer Erkennungssequenz eines Restriktionsenzymes führen, können PCR-Fragmente auch in einem Restriktionsansatz hydrolysiert werden, dieser Nachweis wird als CAPS-Marker (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) bezeichnet (Bäumler et al., 2003a; Benting et al., 2004; Kim et al., 2003; Schwarz et al., 2004). Auch erfolgte eine DHPLC-Analyse (Denaturing High Pressure Liquid Chromatography) der PCR-Fragmente (Bäumler et al., 2003a; Bäumler et al., 2003b; Schwarz et al., 2004). Eine Allel-spezifische PCR ist oft einsetzbar, bei der zwei Primerkombinationen verwendet werden, die sich nur in einem Nukleotid (entspricht der Mutation) am 3'-Ende unterscheiden (Bäumler et al., 2003b; Robinson et al., 2002). Der Allel-spezifische Ansatz wurde oftmals durch quantitative oder Realtime-PCR ergänzt, da diese Techniken es erlauben, beide Allele in einer Reaktion nachzuweisen (Benting et al., 2004; Fraaje et al., 2002; Schwarz et al., 2004). Detaillierte Beschreibungen verschiedener geeigneter SNP-Nachweismethoden sind bei Bäumler (2004) zu finden.

### **3 Material und Methoden**

Die durchgeführten Arbeiten gehörten zu drei verschiedenen Teilbereichen: 1) Molekulare Untersuchungen von Isolaten des Apfelmehltaus, 2) Virulenztestungen von Apfelmehltau-Isolaten auf einem *Malus*-Testsortiment und 3) Fungizidtestungen ausgewählter Apfelmehltau-Isolate mit einem Strobilurin-Fungizid. Dabei wurden die meisten Apfelmehltau-Isolate in mehr als einem Bereich in die Untersuchungen einbezogen.

#### **3.1 Biologisches Material**

##### **3.1.1 *In vitro*-Kulturen der Wirtspflanze *Malus***

Sprossspitzen des mehltauanfälligen *Malus x domestica* 'Gibb's Golden Gage' wurden wie bei Urbanietz (2002) beschrieben in 250 ml Kulturgläsern auf Murashige und Skoog-Medium

M8 (Hanke, 1994) unter kontrollierten Bedingungen (16 h Tag bei 22- 24 °C und 8 h Nacht bei 16 °C) im Kulturraum kultiviert. Junge Sproßspitzen wurden als Wirtspflanze für die Kultur von Mehltausisolaten verwendet.

### **3.1.2 Testsortiment der Gattung *Malus* zur Virulenztestung von Apfelmehltau-Isolaten**

Um ein geeignetes Sortiment für die Unterscheidung von Mehltaurassen zu entwickeln, wurden 41 *Malus*-Genotypen ausgewählt (Tabelle 2). Die Informationen über die Reaktion gegenüber Mehltau stammen aus eigenen Beobachtungen, persönlichen Mitteilungen (Schmidt, Marburg; Fischer, Dresden-Pillnitz) und aus der Literatur. Reiser der ausgewählten Genotypen wurden auf die Apfelunterlage M9 veredelt und befallsfrei im Gewächshaus kultiviert. Die Testungen wurden während der Saison zwischen Februar und September durchgeführt, danach befanden sich die Pflanzen in Winterruhe. Vor Beginn der Versuche wurde der frische Austrieb der Pflanzen einmalig mit dem Fungizid Systhane 20 EW prophylaktisch behandelt. Mit den Testungen wurde nach Ablauf der Wartezeit des Pflanzenschutzmittels begonnen. Für die Testungen wurden nur die jeweils drei jüngsten noch nicht vollständig entwickelten Blätter verwendet.

Es wurden zwei Sets an Genotypen zusammengestellt. Das erste enthielt die Genotypen, die die bekannten und detailliert beschriebenen Resistenzgene gegen Apfelmehltau tragen. Diese sind A142/5 (*PI1*), *M. zumi* 274 (*PI2*), D12 (*PId*), MIS (*PI<sub>mis</sub>*) und E295-4 (*PI<sub>w</sub>*; abstammend von 'White Angel' (James und Evans, 2004)). Zudem wurden vorhandene Bäume aus einer Kreuzungsnachkommenschaft einer Kreuzung zwischen *PI1*- und *PI2*-Trägern verwendet, die entweder *PI1*, *PI2* oder beide Gene tragen (für den Stammbaum der Sämlinge siehe Abbildung 1, teilweise entnommen aus Krüger (1994)). Das Vorhandensein der betreffenden Gene *PI1* und *PI2* wurde durch Markeranalyse (AT20SCAR für *PI1*, N18 und U2 für *PI2*) nachgewiesen bzw. die Resistenz der Pflanzen durch Feldbeobachtung bestätigt (Dunemann, persönliche Mitteilung).

Das zweite Set an Genotypen umfasste verschiedene Apfelwildarten und –sorten mit bekannter, jedoch nicht näher charakterisierter Resistenz, sowie anfällige Kontrollgenotypen (siehe Tabelle 2).

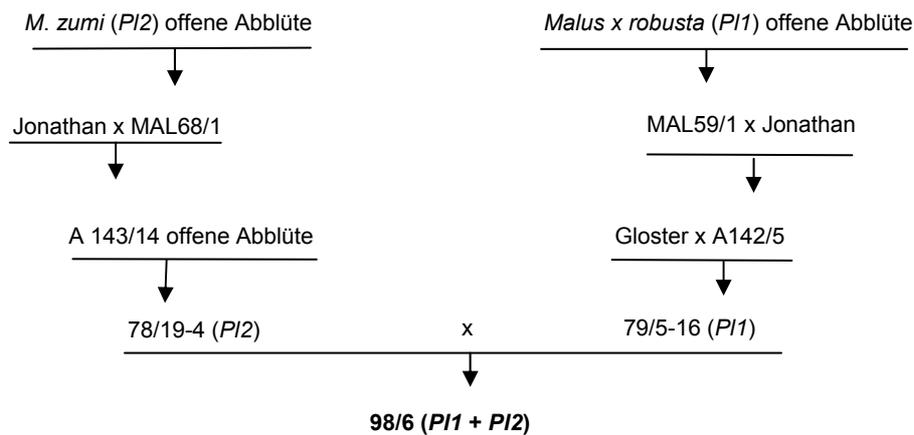
**Tabelle 2: *Malus*-Testsortiment für Pathogenitätstests**

<b>Genotyp</b>	<b>Reaktion gegenüber Mehltau</b>	<b>Resistenzgen</b>
<b>Genotypen mit definierter Resistenz</b>		
<i>M. x robusta persicifolia</i>	resistent	PI1
A 142/5*	resistent	PI1
<i>M. zumi</i> 274	resistent	PI2
D 12	resistent	PId
E295-4 'White Angel'	resistent	PIw
Mildew Immune Selection MIS	resistent	PI <sub>mis</sub>
98/6-21	resistent	PI1
98/6-29	resistent	PI1
98/6-1	resistent	PI2
98/6-9	resistent	PI2
98/6-11	resistent	PI2
98/6-10	resistent	PI1 + PI2
98/6-2	resistent	PI1 + PI2
98/6-4	resistent	PI1 + PI2
98/6-5	resistent	PI1 + PI2
<b><i>Malus</i> Wildarten und <i>Malus domestica</i> -Sorten ohne definierte Resistenz</b>		
<i>M. baccata mandshurica</i> 778	resistent	unbekannt
<i>M. hupehensis</i> 341	resistent	unbekannt
<i>M. hupehensis</i> E 334-62	resistent	unbekannt
<i>M. sieboldii</i> 722	resistent	PI <sub>sb</sub>
<i>M. sieversii</i> 3569	wenig anfällig	
<i>M. sieversii</i> 3575	wenig anfällig	
<i>M. sieversii</i> 3600	wenig anfällig	
<i>M. sieversii</i> 4011	wenig anfällig	
<i>M. sieversii</i> 4031	wenig anfällig	
<i>M. sieversii</i> 4035	wenig anfällig	
<i>M. sylvestris</i> 218	resistent	unbekannt
<i>M. trilobata</i> 428	resistent	unbekannt
'Alkmene' <sup>***</sup>	wenig anfällig	
'Carola'	wenig anfällig	
'Danziger Kant'	wenig anfällig	
'Delicious'	anfällig	
'Democrat'	wenig bis mittel anfällig	
'Discovery'	wenig anfällig	
'Dülmener Rosenapfel'	wenig anfällig	
'Gibb's Golden Gage'	sehr anfällig	
'Laxton's Superb'	sehr anfällig	
'Peasgood's Nonesuch'	wenig anfällig	
Pi-AS-22/17	wenig anfällig	
'Prima'	wenig anfällig	
'Rewena'	resistent	unbekannt
'Rote Sternrenette'	wenig anfällig	
'Tydeman's Late Orange'	mittel bis wenig anfällig	

\* Genotypen ohne genaue Art- und Gattungsangabe sind Zuchtklone, teilweise aus Kreuzungen zwischen Wildarten und Sorten

\*\* Wildarten mit einer Nummernbezeichnung sind einzelne Genotypen aus einer Population

\*\*\* Namen in Anführungsstrichen ('xxx') sind Sorten von *Malus x domestica*



**Abbildung 1: Stammbaum der *Malus*-Genotypen aus der Population 98/6, mit pyramidierten Resistenzen *PI1* und *PI2***

### 3.1.3 Herstellung von Einsporisolen von *Podosphaera leucotricha*

Es wurden Einsporisolate des Apfelmehltau *Podosphaera leucotricha* hergestellt (Tabelle 3). Diese wurden genutzt, um in molekularen Analysen einen Überblick über die vorhandene Variabilität zu gewinnen. Ein Teil dieser Isolate wurde in den Virulenztestungen auf dem *Malus*-Testsortiment genutzt, um die Variabilität hinsichtlich der Virulenz zu testen (Ahr-11, InA2-15, InA2-20, InA3-11, InA3-21, In6-a, In6-c, In4f, Ch9-1-11, ChI-5, ChIII-8, F1-12). Weitere Isolate wurden gezielt in Anlagen gesammelt, die unbehandelt waren oder intensiv mit Strobilurin-Fungiziden behandelt wurden (D1 bis D8, P1 bis P4, S3, S8). Diese Isolate wurden ausschließlich für Analysen des *Cytochrom b*-Gens verwendet. Für molekulare Analysen des *Cytochrom b*-Gens wurden von den vorhandenen 40 aufgelisteten Isolaten 36 verwendet, außer den folgenden vier: Pilln-1, Ch-IV-7, ChVIII-5, ChIX-3. In Tabelle 3 sind Herkunft (Ort und Wirtspflanzengenotyp) und Datum der Isolierung angegeben. Zusätzlich ist, wo bekannt, der Fungizidhintergrund angegeben. Für wenige Isolate wurden partielle Sequenzen des *Cyt b*-Gens in der NCBI GenBank hinterlegt, die Accessionsnummern sind in diesen Fällen ebenfalls angegeben.

Zur Gewinnung von Einsporisolen wurden zum einen ruhende Triebe der in Tabelle 3 angegebenen *Malus*-Sorten, die starken Mehltaubefall aufwiesen, angetrieben, um frisches, infiziertes Blattmaterial zu erhalten (in der Tabelle mit Befallstyp "primär" bezeichnet). Einzelne Konidienträger wurden von jungen Mehltaukolonien des Primärbefalls mittels einer Impfnadel unter dem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss, Oberkochen) abgenommen und auf junge *In vitro*-Blätter von *Malus x domestica* 'Gibb's Golden Gage' übertragen. Die *In*

*vitro*-Blätter wurden in kleinen Glaspetrischalen (Durchmesser 5 cm) auf Benzimidazolagar platziert.

**Tabelle 3: Herkunft der reinen Einsporisolate von *Podosphaera leucotricha***

Isolat	Herkunft	Befalls- typ	Isoliert von	Isoliert in	NCBI GenBank Accessionsnummer Cyt <i>b</i> - Sequenz**
<b>Isolate mit unbekannter Fungizidgeschichte*</b>					
Ahr-11	Deutschland, Ahrensburg	sekundär	'Bittenfelder' Sämling	2000	Ahr-11-133***: 802683
Ahr-D	Deutschland, Ahrensburg	sekundär	89-9/4	2000	
GB43-K2	Großbritannien, East Malling	primär	E 624-43	2000	GB-43K2-3: 798791
G-PxG	Griechenland, Naoussa	primär	Sämling 'Prima' x 'Gala'	2000	
FGDT4	Frankreich, Angers	primär	'Golden Delicious'	2000	
I-Coop 16	Italien, Bologna	primär	Coop 16	2000	
Pilln- 1	Deutschland, Dresden- Pillnitz	sekundär	'Priscilla'	2000	
In A2-14	Indien, Bajaura	primär	'Starking Delicious'	2003	
In A2-15	Indien, Bajaura	primär	'Starking Delicious'	2003	
In A2-20	Indien, Bajaura	primär	'Starking Delicious'	2003	
In A2-26	Indien, Bajaura	primär	'Starking Delicious'	2003	
In A2-27	Indien, Bajaura	primär	'Starking Delicious'	2003	
In A3-11	Indien, Bajaura	primär	'Starking Delicious'	2003	
In A3-21	Indien, Bajaura	primär	'Starking Delicious'	2003	
In A3-23	Indien, Bajaura	primär	'Starking Delicious'	2003	
In 6 a	Indien, Bajaura	primär	'Vance Delicious'	2002	
In 6 b	Indien, Bajaura	primär	'Vance Delicious'	2002	
In 6 c	Indien, Bajaura	primär	'Vance Delicious'	2002	In6c-71: 812272
In 4 f	Indien, Bajaura	primär	'Granny Smith'	2002	
Ch 9-1-11	China, Laiyang	sekundär	'Jonagold'	2004	
Ch 9-1-28	China, Laiyang	sekundär	'Jonagold'	2004	
F1-12	China, Laiyang	sekundär	'Fuji'	2004	F1-12-153: 812254
Ch I-4	China, Xingping	sekundär	unbekannt	2004	
Ch I-5		sekundär	unbekannt	2004	
Ch III-8		sekundär	'Fuji'	2004	
Ch III-10		sekundär	'Fuji'	2004	
Ch IV-7		sekundär	'Qinguang'	2004	
Ch VIII-5		China, Yangling	sekundär	'Guo-guang'	2004
Ch IX-3		sekundär	'Guo-guang'	2004	

\* unbekannte Fungizidgeschichte: Es liegt keine Information über ein Fungizidmanagement in diesen Anlagen vor. Die dort gesammelten Isolate sind seit ihrer Isolierung nicht mit Fungiziden in Kontakt gekommen.

\*\* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

\*\*\*Sequenz von Klon 133 des Isolates Ahr-11, bei den anderen Isolaten die entsprechende Klonnr.

**Fortsetzung Tabelle 3: Herkunft der reinen Einsporisolate von *Podosphaera leucotricha***

Isolat	Herkunft	Befalls- typ	Isoliert von	Isoliert in	Fungizidgeschichte der Anlage, aus der Proben genommen wurden	
<b>Isolate mit bekannter Fungizidgeschichte</b>						
D1	Deutschland, Dürreweitzschen	sekundär	unbekannt	2004	kommerzieller Anbau; bis zu 10 Strobilurinapplikationen von 1996 bis 2003, keine Applikation in 2004	
D2						
D3						
D4						
D5						
D8						
P1	Deutschland, Dresden-Pillnitz	sekundär	unbekannt	2004	Versuchsanbau; jeweils 12 Strobilurinapplikationen in 2003 und 2004	
P2		sekundär				Versuchsanbau; 12 Strobilurinapplikationen in 2003
P4		sekundär				Ökologischer Versuchsanbau (in Nachbarschaft zu Fungizid-behandeltem Versuchsfeld)
S3		sekundär				Ökologischer Anbau, keine Strobilurin- Fungizidanwendung
S8		sekundär				drei Strobilurinapplikationen in 2004

Die chinesischen Isolate wurden von Blättern isoliert, die während der Vegetationsperiode befallen wurden (in der Tabelle mit Befallstyp "sekundär" bezeichnet). Bei erfolgreicher Infektion von einzelnen *In vitro*-Blättern von *Malus x domestica* 'Gibb's Golden Gage' wurde erneut ein einzelner Konidienträger abgenommen und auf ein neues Blatt übertragen. Dieser Vorgang wurde mindestens fünfmal wiederholt, danach wurde die Kultur als reines Einsporisolat betrachtet. Die Herkünfte der Isolate sind in Tabelle 3 genannt. Die Isolate Ahr-11, Ahr-D, GB43-K2, FGDT4, G-PxG, I-Coop 16 und Pilln-1 wurden als Referenzisolate aus einer bestehenden Sammlung des Julius-Kühn-Instituts, Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Dresden übernommen.

### 3.1.4 Erhaltung und Vermehrung von Pilzisolaten

Um die Isolate von *P. leucotricha* rein zu erhalten, wurden sie auf *In vitro*-Sprossspitzen von *M. x domestica* 'Gibb's Golden Gage' kultiviert. Die Kultivierung erfolgte auf dem Kulturmedium M8 ohne Hormone, um das Wachstum der Blätter zu verstärken und die beerntbare Blattfläche zu vergrößern. Die Inokulation der Blätter mit den jeweiligen

Einsporisolate erfolgte, indem infizierte, stark sporulierende Blätter über junge Blätter der Sprossspitze gestrichen wurden. Um ausreichend pilzliches Ausgangsmaterial für molekularbiologische Arbeiten zu erhalten, wurden ausgewählte Isolate zusätzlich auf Sämlingen, gezogen aus Kernen der anfälligen Sorte 'Pinova' (freie Abblüte), in kleinen abgeschlossenen Gewächshauskabinen vermehrt.

### 3.1.5 Pathogenitätstestung der Pilzisolat auf dem *Malus*-Testsortiment

Die Testung der Pathogenität ausgewählter Apfelmehltau-Isolate wurde wie bei Urbanietz (2002) beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die jüngsten Blätter der Testpflanzen (Tabelle 2Tabelle ) im Gewächshaus entnommen und in Petrischalen auf Benzimidazolagar plaziert. Benzimidazol wurde dem Medium hinzugefügt, um die Blattalterung zu verzögern. Am folgenden Tag wurden diese Blätter in einem Inokulationsturm mit Sporen aus 6 bis 10 Kulturgläsern (3 Pflanzen pro Glas) von *in vitro* angezogenen Isolaten inokuliert und die Petrischalen mit Parafilm verschlossen. Der Inokulationsturm wurde nach jeder Behandlung mit Alkohol gründlich desinfiziert, um eine Vermischung der Isolate zu verhindern. Die ausgebrachte Sporenmenge wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer und einem Lichtmikroskop Axioskop (Zeiss, Oberkochen) bestimmt. Dabei wurde eine Sporendichte von etwa 5 Sporen pro cm<sup>2</sup> Blattfläche angestrebt. Anschließend wurden die Blätter im Kulturenraum bei einem Regime von 16 h Tag (22- 24°C) und 8 h Nacht (16°C) inkubiert. Nach 15 Tagen erfolgte die Bonitur des Befalls (Vorhandensein von Konidienketten) und eine Einschätzung der Befallsstärke (in % befallener Blattfläche) mit Hilfe eines Stereomikroskops Stemi SV11 (Zeiss). Die Bewertung erfolgte auf jedem Blatt einzeln in 10%-Schritten (von 0-100%). Blätter mit einzelnen Konidienträgern wurden mit 5% bewertet (nach Linde und Debener (2003)). Anhand der bonitierten Daten von *i*% (incidence, Anzahl der Blätter mit Mehltaubefall) und *s*% (severity, Größe der befallenen Blattfläche) wurde die durchschnittlich befallene Blattfläche *a*% (infected area) berechnet. "Severity" und "incidence" sind nach Caffier und Parisi (2007) und Jeger et al. (1986) korreliert. Daher wird im Ergebnisteil zumeist *a*% dargestellt, da es zudem noch die Blätter miteinbezieht, die nicht befallen sind.

Die bestimmten Endpunkte waren folgende:

Anzahl getesteter Blätter (*n*)

Anzahl infizierter Blätter (*i*) als Untergruppe von *n*

Incidence (*i*%): Prozentualer Anteil der befallenen Blätter

$$i\% = \frac{i}{n} \times 100$$

Severity (s%): Arithmetisches Mittel der prozentualen infizierten Fläche infizierter Blätter, wobei s%<sub>j</sub> die infizierte Fläche des infizierten Blattes j angibt

$$s\% = \frac{\sum_{j=1}^i s\%_j}{i}$$

Infected area (a%): Mittelwert der prozentualen infizierten Fläche aller getesteten Blätter, wobei s%<sub>j</sub> die infizierte Fläche des infizierten oder nicht infizierten Blattes j angibt

$$a\% = \frac{\sum_{j=1}^n s\%_j}{i}$$

Es wurden die Standardabweichungen für s% und a% berechnet. Genotypen wurden als anfällig eingestuft, wenn der Mittelwert für a% über alle Isolate höher als 20% war. Genotypen, die einen durchschnittlichen a%-Wert von 10-20% erreichten, wurden als moderat anfällig bewertet. Als resistent galten somit Genotypen mit a%-Werten <10, wobei bei Werten von <5 von hochgradig resistent gesprochen werden kann.

### 3.1.6 Analyse der Fungizidresistenz von Mehltausisolaten

Um einen Zusammenhang zwischen der Mutation des mitochondrialen Cytochrom *b*-Gens mit einer möglichen Reduktion der Fungizidsensitivität einzelner Isolate zu untersuchen, wurde die Sensitivität von Apfelmehltau-Isolaten gegenüber dem Fungizid in *In vitro*-Blatttests und in Sporenkeimtests getestet. Die Fungizid-Sensitivitätstests wurden mit der praxisüblichen Formulierung des Strobilurins Trifloxystrobin (Handelsname Flint, Bayer Crop Science, Langenfeld) durchgeführt. Die empfohlene Dosierung für Trifloxystrobin gegen Apfelmehltau im Feld ist 0,05 g aktive Substanz/l. Es wurden folgende Fungizidkonzentrationen eingesetzt: 0; 0,0005; 0,0025; 0,005; 0,025; 0,05; 0,125; 0,25 und 0,375 g aktive Substanz/l. Um eine gute Verteilung des Wirkstoffes auf der Oberfläche sicherzustellen, wurden der Fungizidsuspension drei Tropfen Tween 20 auf 50 ml beigemischt.

#### 3.1.6.1 Blatt-Testungen

Für die Sensitivitätstestungen auf Blättern wurden *Malus x domestica* 'Gibb's Golden Gage' *In vitro*-Blätter auf Benimidazolagar platziert und bis zur vollkommenen Benetzung mit dem Fungizid besprüht. Die Schalen mit den Blättern wurden offen stehengelassen, bis der Spritzbelag angetrocknet war. Die Inokulation mit Mehltau erfolgte am folgenden Tag, indem

stark sporulierende *In vitro*-Blätter über die Testblätter gestrichen wurden. Es wurden drei Isolate ausgewählt (GB-43K2, Ahr-11 und In6c) und auf ihre Sensitivität getestet. Die Petrischalen wurden bei 22-24 °C und 16 h Licht inkubiert. Die Bonitur auf Vorhandensein und Intensität von Mehltauinfektionen erfolgte 21 Tage nach Inokulation.

Zur mikroskopischen Auswertung der Blatt-Sensitivitätstestungen wurden die *In vitro*-Blätter über Nacht in 98% Ethanol entfärbt, die pilzlichen Strukturen anschließend in essigsaurer Tinte angefärbt und nach kurzem Waschen in Wasser in Mikroskopierlösung (50% (v/v) Glycerol) aufbewahrt. Mikroskopische Analysen von Blättern wurden mit einem Stemi SV11 (Zeiss) durchgeführt, die Keimrate der Sporen in Fungizidtestungen mit einem Axioskop (Zeiss) bestimmt. Fotos wurden mit einer Nikon CoolPix 5000 Kamera (Nikon, Düsseldorf) aufgenommen.

### 3.1.6.2 Sporenkeimtests

Da Sporen des Apfelmehltau nicht auf künstlichen Materialien wie z. B. Glas, Agar oder Polyethylen keimen, wurden die Keimtests auf enzymatisch isolierten Kutikeln durchgeführt (Schulze, 2005). Dazu werden Blattscheiben aus frischen, vollständig entwickelten Freiland-Blättern ausgestanzt und mit einer 3%igen Pektinase-Lösung infiltriert. Nach zwei Wochen lassen sich die Kutikeln von den übrigen Schichten des Blattes lösen und werden nach verschiedenen Reinigungsschritten getrocknet. Für diese Versuche standen Kutikeln der *Malus x domestica*-Sorte 'Jonathan' zur Verfügung (erhalten von J. Montag, Institut für Obstbau, Universität Hannover). Die Kutikularmembranen wurden auf dünne Schichten (ca. 1mm) Wasseragar auf Objektträgern platziert. Um ein Austrocknen der Membranen zu verhindern, wurden die Objektträger in geschlossenen Petrischalen zusammen mit angefeuchtetem Papier platziert. Die Kutikeln wurden mit steigenden Fungizidkonzentrationen (siehe oben) behandelt, die getrockneten Kutikeln am folgenden Tag wie oben beschrieben inokuliert. Nach zwei Tagen wurde der Anteil gekeimter Sporen bestimmt, indem 9 Wiederholungen von je 200 Konidien pro Kutikel ausgezählt wurden.

### **3.1.7 Anzucht und Kultur von Bakterien zur Transformation**

Zur Transformation von Bakterien mit DNA-Fragmenten wurde der *Escherichia coli*-Stamm JM109 (Promega, Mannheim) verwendet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37°C, auf LB-Platten (Luria-Bertani-Medium) im Inkubator oder in Flüssigkultur bei 350 rpm im Schüttler. Über kürzere Zeiträume (ca. vier Wochen) wurden die Bakterien bei 4°C gelagert. Für eine längere Aufbewahrung wurde eine Flüssigkultur in 15% Glycerin hergestellt und bei -80°C eingefroren.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Präparation pilzlicher DNA von frischen Blattproben**

Myzel und Sporen des Pilzes wurden mittels einer Vakuum-Blot-Pumpe (Hybaid, Heidelberg), an die eine Pipettenspitze mit Filter angeschlossen wurde, gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die genomische DNA des Pathogens wurde mit einer abgewandelten CTAB- (Cetyltrimethylammoniumbromid) Methode (Urbanietz, 2002) isoliert. Dazu wurde das pilzliche Material in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und mittels einer Schwingmühle MM300 (Retsch, Haan) mit 3 Stahlkugeln (2 mm Durchmesser) bei 30 Schwingungen/s für 2 min zerkleinert. Der Zellaufschluss erfolgte in 2 x CTAB-Puffer für 30 min bei 65°C. Nach anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die RNA mit 3 µl 10%iger RNase A (Roche, Mannheim) bei 37°C 1 h abgebaut. Darauf wurde eine weitere Phenol/Chloroform-Reinigung durchgeführt und anschließend wurde die DNA mit 2,5 Volumen 99% Ethanol und 0,2 Vol. 3 M NaAc (pH 5,2) gefällt. Nach Resuspension in destilliertem Wasser wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Alternativ erfolgte die DNA-Isolierung mit dem DNeasy-Plant-Mini-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

### **3.2.2 Präparation pilzlicher DNA von getrockneten Blattproben und Rinde**

Getrocknete Blattproben mit pilzlichem Myzel aus verschiedenen geographischen Regionen wurden verwendet, um die Variabilität des Apfelmehltaus auf molekularer Ebene zu untersuchen. Um DNA von infizierten, getrockneten Blättern zu isolieren, wurde der NucleoSpin Plant-Kit der Firma Macherey & Nagel (Düren) eingesetzt. Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers, mit zwei zusätzlichen Waschschritten mit Puffer CW, wie bei Schwarz et al. (2004) beschrieben. Es wurden kleine, befallene Blattstückchen (Durchmesser ca. 5 mm) oder deutlich befallene, abgekratzte Rinde (ca. 0.02 g) als Ausgangsmaterial verwendet. Getrocknetes Blattmaterial war von verschiedenen Standorten vorhanden (Lai-yang, Yangling und Xingping, China; Borten und Pirna bei Dresden, Deutschland; East Malling, Großbritannien; Bajaura, Kullu-Valley, Indien; Gödöllő, Pecs, Szabadka und Budapest, Ungarn; siehe Tabelle A1: Mehltau-Feldproben). Dabei handelte es sich zum Großteil um kommerzielle Anlagen, im Gegensatz zu den Isolat, die zumeist nicht aus kommerziellen Anlagen stammten. Von dem Material wurden repräsentativ Proben entnommen und zur DNA-Präparation verwendet.

### **3.2.3 Agarose-Gel-Elektrophorese**

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gele in unterschiedlichen Konzentrationen (0,8 bis 2 %ig) hergestellt. Dazu wurde die Agarose in 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA) -Puffer durch kurzes Aufkochen gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Als Ladepuffer wurden Bromphenolblau oder Xylencyanol verwendet. Als Größenstandard wurde die GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) eingesetzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in der Regel bei einer Spannung von 50-150 Volt bei maximaler Stromstärke und einer Laufzeit von 1-6 h. Die Auswertung der Gele erfolgte unter UV-Licht mit einem Transilluminator und der Software Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Für die Quantifizierung von DNA wurden λ-DNA-Mengenstandarts in einer Verdünnungsreihe von 10 ng, 50 ng, 100 ng und 200 ng mitgeführt. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der DNA-Proben mit den λ-Standarts mit der Software Quantity One (Bio-Rad).

### **3.2.4 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese**

Zur hochauflösenden Auftrennung der amplifizierten Fragmente wurde der PCR-Ansatz (siehe 3.2.5) mit 10 µl Ladepuffer verdünnt, die DNA 3 min bei 94°C denaturiert und die Proben auf einem 6,6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel "KB-Plus", Plattenlänge 25 cm, im NEN Global IR<sup>2</sup> LI-COR Sequencer (alles LI-COR Biosciences, Bad Homburg) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 1400 V in 1 x TBE. Als Größenstandard wurde 50-350bp Concentrated Size Standard (IRD 700 und 800; LI-COR Biosciences) parallel aufgetragen. Die Auswertung der Banden erfolgte manuell mit der e-seq-Software des Sequencers.

### **3.2.5 Entwicklung und Anwendung molekularer Marker**

Für alle PCRs wurden die Thermocycler Mastercycler® Gradient (Eppendorf AG, Hamburg), iCycler Thermal Cycler bzw. MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) verwendet.

#### 3.2.5.1 Mehltauspezifischer PCR-Marker PM-33

Von einer *Blumeria*-Sequenz (COGEME-Datenbank, <http://cogeme.ex.ac.uk>, Bg[1962]) wurden Primer abgeleitet und das entsprechende Fragment für den Apfelmehltau amplifiziert, kloniert und sequenziert (siehe Kapitel 3.2.6). Die Spezifität für den Apfelmehltau wurde auch mit Apfel- und Apfelschorf-Proben bestätigt. Das Primerpaar PM33 (siehe Tabelle A2, Anhang) wurde zum Nachweis von Mehltau-DNA in Blattproben verwendet. Dazu wurde eine PCR mit einem Gesamtvolumen von 25 µl in 1 x Reaktionspuffer (Invitex,

Berlin) durchgeführt, mit 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, je 1,0 µM beider Primer und 1 U *Taq*-Polymerase (Invitek). Dabei wurden 25 ng DNA als Template eingesetzt. Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt:

1 x	initiale Denaturierung	95 °C	5 min
30 x	Denaturierung	95 °C	45 s
	Annealing	52 °C	1 min
	Elongation	72 °C	2 min
1 x	Abschluss-Elongation	72 °C	10 min

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf 1,5%igen Agarose-Gelen aufgetrennt und wie beschrieben ausgewertet.

### 3.2.5.2 RAPD-Analysen

Es wurden verschiedene Kombinationen von RAPD-Primern (20mere, Debener und Mattiesch, 1998) getestet, aber nur wenige lieferten verlässliche polymorphe Marker. Für die Analyse der Proben wurde DNA der Pilzisolat und Freilandproben mit dem RAPD-Primer (Random Amplified Polymorphic DNA) RAPD499 und einem spezifischen Primer LTR3 (Tabelle A2) in Kombination untersucht. Der LTR3-Primer basiert auf einer Apfelmehltausequenz, die mit Primern erzeugt wurde, die von der *Blumeria*-Sequenz Bg [1472] (Cogeme-Datenbank) für ein LTR-Retroelement abgeleitet wurden. Dazu wurde eine PCR mit einem Gesamtvolumen von 25 µl in 1 x Reaktionspuffer (Invitek) durchgeführt, mit 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, je 1,0 µM beider Primer und 1 U *Taq*-Polymerase (Invitek). Dabei wurden 25 ng DNA als Template eingesetzt. Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt:

1 x	initiale Denaturierung	95 °C	5 min
	Annealing	55 °C	1 min
	Elongation	72°C	2 min
30 x	Denaturierung	95 °C	30 s
	Annealing	56 °C	1 min
	Elongation	72 °C	2 min
1 x	Denaturierung	95 °C	30 s
	Annealing	55 °C	1 min
	Abschluss-Elongation	72 °C	7 min

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf 1,5%igen Agarose-Gelen aufgetrennt und wie beschrieben ausgewertet.

### 3.2.5.3 Mikrosatelliten (SSRs, Simple Sequence Repeats)

Die Entwicklung der Mikrosatellitenmarker erfolgte verändert nach Fischer und Bachmann (1998).

#### *Vorarbeiten zur Anlage einer genomischen Bank*

Zur Entwicklung von SSR-Markern wurde eine partielle genomische Bank von *P. leucotricha* angelegt, die für verschiedene Mikrosatelliten angereichert wurde. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl 6 µg genomischer DNA des Pilzes mit dem Restriktionsenzym *RsaI* (6 U/ µg DNA) in 1x Reaktionspuffer Y-Tango (beides MBI Fermentas) bei 37 °C für mindestens 3 h komplett verdaut. Anschließend wurde das Enzym durch Hitzebehandlung (20 min bei 65°C) inaktiviert. Um das Ergebnis des Verdau zu kontrollieren wurde eine Probe (2 µl) auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. An die durch den Verdau entstandenen Fragment-Enden wurden Adapter (SSR-Adapter oben und unten, siehe Tabelle A2) ligiert. Dazu wurden je 50 mM Adapter gemischt, für 3 min bei 95 °C denaturiert und auf RT abgekühlt. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 60 µl in 1x Reaktionspuffer Y-Tango, mit 1 U T4-Ligase, 6 µl PEG 4000, 60 mM ATP (alles MBI Fermentas) und 3 µl SSR-Adapter-Mix, bei RT für 4 bis 6 h. Anschließend wurde das Enzym durch Hitzebehandlung (10 min bei 65°C) inaktiviert und das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt. Die DNA wurde in 0,2 Vol. 10 M NH<sub>4</sub>Ac und 2,5 Vol. Ethanol (99%) bei RT für 10 min gefällt, nach Zentrifugation (13.000 rpm) und Wiederaufnahme des Pellets in Wasser folgte eine zweite Fällung bei -20 °C für 20 min, mit anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm. Nach zwei Waschschritten in 70 % Ethanol wurde das entstandene Pellet in 36 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

#### *Anreicherung von Fragmenten mit SSR-Motiv*

Um gezielt DNA-Fragmente zu selektieren, die Mikrosatellitenmotive enthalten, wurde eine Hybridisierung der Fragmente mit Oligonukleotiden durchgeführt. Diese bestanden aus Mikrosatelliten-Motiven (siehe Tabelle 4), die mit Biotin markiert waren. Zur Hybridisierung wurden zwei Pools von unterschiedlichen Motiven verwendet, zusammengestellt aufgrund ähnlicher Hybridisierungs-Temperaturen.

**Tabelle 4: Für die Anreicherung verwendete Oligonukleotide.**

Nr.	Pool	Oligosequenz	TM [°C]	Hybridisierungstemperatur [°C]
1	I	(CT)10	69.9	60
2		(TAA)8	62.5	
3	II	(CA)10	80.4	75
4		(GAA)8	78.0	
5		(AAC)8	82.2	

Die Hybridisierungsreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 65 µl durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde eingestellt auf 6 x SSC und enthielt neben der vorbereiteten DNA (36 µl) jedes Oligonukleotid des entsprechenden Pools in einer Konzentration von 10 mM. Zunächst wurde das Gemisch für 5 min bei 98°C denaturiert und nach anschließender Abkühlung auf die Hybridisierungstemperatur des jeweiligen Pools weitere 20 min inkubiert. Zur Selektion der Biotin-markierten Fragmente wurden diese an Streptavidin-markierte Magnetic Beads (Dyna, Hamburg) gebunden. Die Magnetic Beads wurden vorher durch zweimaliges Waschen in 1 x B&W-Puffer (Dyna) equilibriert. Die Bindung der Biotin-markierten DNA-Fragmente an die Magnetic Beads erfolgte durch 15-minütige Inkubation bei RT. Danach wurden die Beads mit einem Magneten gesammelt und zweimal mit B&W-Puffer gespült. Das Mobilisieren der Fragmente von den Beads erfolgte für 2 min bei 90°C in Eluierungspuffer. Um die Ausgangsmenge an DNA zur Klonierung zu erhöhen wurden die eluierten Fragmente mittels PCR amplifiziert. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 1 x Reaktionspuffer (Invitex) durchgeführt, mit 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 µM oberen Adapter als Primer und 1 U *Taq*-Polymerase (Invitex). Dabei wurden 2 µl der eluierten Fragmente als Template eingesetzt.

1 x	initiale Denaturierung	95 °C	5 min
30 x	Denaturierung	95 °C	45 s
	Annealing	56 °C	1 min
	Elongation	72 °C	2 min
1 x	Abschluss-Elongation	72 °C	10 min

Nach Fällung mit NH<sub>4</sub>Ac und Ethanol (s.o.) und Resuspension in 10 µl destilliertem Wasser wurde eine zweite Anreicherung durchgeführt. Vor der Klonierung in einen Vektor wurden die Fragmente erneut durch Fällung gereinigt. Die Klonierung der Fragmente in den Vektor pGem-T Easy erfolgte wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben.

### *Selektion von Klonen mit SSR-Motiv*

Um die Sequenzierung von Klonen ohne Mikrosatellitenmotiv zu vermeiden, wurde ein weiterer Selektionsschritt angeschlossen. Dazu wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, wobei je ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne Zugabe von 1 µl der zur Hybridisierung verwendeten Oligonukleotid-Pools als zusätzliche Primer angesetzt wurden. Der PCR-Ansatz entsprach bis auf die Mikrosatelliten-Pools der normalen Kolonie-PCR (siehe 3.2.6) mit den M13-Primern. Die zwei Ansätze pro Kolonie wurden nebeneinander auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Fragmente, die ausreichender Größe waren (mindestens ca. 200 bp) und die nach Vorselektion ein SSR-Motiv enthielten, wurden sequenziert.

### *Primerentwicklung*

Es wurden nur die Sequenzen von Fragmenten zur weiteren Bearbeitung ausgewählt, die ein ausreichend langes (ab 6 Wiederholungen) Mikrosatelliten-Motiv enthielten und in denen das Motiv nicht zu nah am Rand lag, um eine ausreichende Anzahl Basen zur Primerableitung zu haben. Primer wurden online mit der Primer3-Software ausgewählt ([http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)). Eine zusätzliche Kontrolle auf mögliche Hairpin- oder Loop-Formationen sowie eine Kontrolle auf Übereinstimmung der Annealing-Temperaturen erfolgte manuell. Die Primer wurden durch die Firmen MWG-Biotech AG (Ebersberg) und Biomers (Ulm) synthetisiert.

Die Primerpaare, die in Vorversuchen die erwarteten Banden amplifizierten, wurden zur Testung der DNA-Proben von Mehltausisolaten verwendet. Dazu wurde eine PCR in einem Gesamtvolumen von 12,5 µl in 1 x Williamsbuffer durchgeführt, mit 0,2 mM dNTPs, je 1,0 µM Primer-forward (IRD-700 bzw. -800 markiert) und -reverse und 0,75 U *Taq*-Polymerase (Invitex). Dabei wurden 25 ng DNA (bzw. 2.5 µl DNA-Lösung der Blattproben) als Template eingesetzt.

1 x	initiale Denaturierung	95 °C	5 min
35 x	Denaturierung	95 °C	30 s
	Annealing	72 °C	45 s
	Elongation	72 °C	1 min
1 x	Abschluss-Elongation	72 °C	10 min

Die Auftrennung der amplifizierten Fragmente auf Polyacrylamidgelen im LI-COR-Sequencer.

#### 3.2.5.4 AFLP-Analysen

Die AFLP-Analyse (Amplified Fragment Length Polymorphism) wurde abgewandelt nach dem Protokoll von Vos et al. (1995) durchgeführt. 50 ng DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 12.5 µl mit zwei Restriktionsenzymen komplett verdaut. Dazu wurden je 1,25 U *Eco*R1 (5'-G↓AATTC-3') und *Tru*1I (Isoschizomer von *Mse*1; 5'-T↓TAA-3') in 1 x Puffer R+ (alles MBI Fermentas) mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert. 5 µl des Verdaus wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um den Erfolg zu kontrollieren. Anschließend wurden an die Enden der entstandenen Fragmente den Schnittstellen entsprechende Adapter ligiert (siehe Tabelle A2). Die Ligation des gesamten Restriktionsansatzes erfolgte in einem Gesamtvolumen von 40 µl in 1 x Puffer R+, mit 15 mM ATP, 2,5 mM *Eco*-Adapter, 25 mM *Mse*-Adapter und 2 U T4-Ligase bei RT über Nacht. Die Prä-Amplifikation wurde mit den Primern *Eco*+0 und *Mse*+0 in 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt, mit 1 x Williams-Puffer, 0,2 mM dNTPs, je 1 µM *Eco*- und *Mse*-Primer und 5 U *Taq*-Polymerase (Invitex), 5 µl des Ligationsansatzes dienten als Template.

20 x	Denaturierung	94 °C	30 s
	Annealing	60 °C	30 s
	Elongation	72 °C	1 min

Eine 1:20 Verdünnung der Präamplifikation wurde als Template in selektiven PCRs eingesetzt, wobei verschiedene Kombinationen der selektiven *Eco*- und *Mse*-Primer (Tabelle A2) verwendet wurden. Es wurde abweichend vom Ausgangsprotokoll eine reduzierte Anzahl selektiver Basen verwendet. Die selektive PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 12,5 µl in 1 x Williams-Puffer, mit 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM *Eco*+2-Primer (IRD-700 markiert) und 1,5 µM *Mse*+2-Primer, 0,5 U *Taq*-Polymerase und 2.5 µl Präamplifikations-Verdünnung als Template mit den unten angegebenen Amplifikationsbedingungen. Die Auftrennung der amplifizierten Fragmente wurde auf einem 6,6 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel "KB-Plus", 25 cm Plattenlänge, im LI-COR Sequencer in 1 x TBE durchgeführt. Die Auswertung der Banden erfolgte manuell mit der e-seq-Software.

1 x	initiale Denaturierung	94 °C	5 min
1 x	Denaturierung	94 °C	30 s
	Annealing	56 °C	30 s
	Elongation	72 °C	1 min
12 x	Denaturierung	94 °C	30 s
	Annealing	66 °C je Zyklus -0,7°C	30 s
	Elongation	72 °C	1 min
24 x	Denaturierung	94 °C	30 s
	Annealing	57 °C	30 s
	Elongation	72 °C	1 min
1 x	Abschluß-Elongation	72 °C	7 min

### 3.2.5.5 AFLP- SCARs (Sequence characterised amplified region)

#### *Isolierung polymorpher Fragmente*

Das Isolieren der einzelnen Fragmente aus einem AFLP-Gel erfolgte, indem der Verlauf der Gelelektrophorese auf dem Monitor des angeschlossenen Rechners verfolgt und die Elektrophorese gestoppt wurde, sobald die entsprechenden Fragmente auf dem Bildschirm erschienen. Die Position des Scanners wurde auf der Glasplatte markiert und der entsprechende Teil des Geles als Streifen ausgeschnitten. Um die Fragmente aus dem Polyacrylamidgel zu eluieren, wurden die Gelstücke in 100 µl Diffusionspuffer 30 min bei 50 °C inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in einer PCR eingesetzt, in der die Fragmente entsprechend den Bedingungen der selektiven AFLP-PCR amplifiziert wurden. Eine Kontrolle, ob tatsächlich das gesuchte Fragment amplifiziert wurde, erfolgte über ein paralleles Auftragen neben der Ausgangs-AFLP-PCR. Die gesuchten Fragmente wurden wie unten beschrieben kloniert und sequenziert, und es wurden geeignete Primer auf beschriebene Weise abgeleitet (s. o.).

#### *Amplifikation spezifischer Fragmente*

DNA der reinen Pilzisolat und der getrockneten Blattproben wurde mit den SCAR-Markern untersucht. Die PCR-Bedingungen entsprachen dabei den Touch-down-Bedingungen für die selektive AFLP-PCR, der Reaktionsansatz enthielt in 20 µl Gesamtvolumen 1 x Williamspuffer, 0,2 mM dNTPs, je 0,5 µM-Primer, 1 U *Taq*-Polymerase (Invitak) und 20 ng DNA (bzw. 2.0 µl DNA-Extrakt der Blattproben). Die Auswertung erfolgte auf 1,5- %igen Agarose-Gelen. Die Auswertung wurde, gemeinsam mit den Daten von der RAPD-Analyse,

entsprechend der AFLP-Analyse durchgeführt, es wurde jeweils Anwesenheit oder Fehlen der Banden bewertet.

### **3.2.6 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Fragmenten**

Die Klonierung von PCR-Fragmenten in den Vektor pGem-T Easy (Promega) erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit 3 µl PCR-Produkt. Nach Transformation in *E. coli* JM109-Zellen durch Hitzeschock für 45 s bei 42°C und Ausplattieren der Zellen auf Ampicillin-haltige LB-Platten (100 mg/l) mit 16 g/l IPTG und 32 g/l X-Gal erfolgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Rekombinante Kolonien wurden mit Hilfe von Blau-Weiß-Selektion ausgewählt.

Um die Größe der klonierten Fragmente zu überprüfen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wurden Einzelkolonien als Template in einen 25 µl PCR-Ansatz, in 1 x Reaktionspuffer (Invitak), mit 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U *Taq*-Polymerase (Invitak) und je 1 µM M13-Primer-forward und -reverse überführt. Die Größe der erhaltenen Fragmente wurde nach der PCR elektrophoretisch bestimmt.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden Einzelkolonien ausgewählter Klone über Nacht bei 37°C, 350 rpm im Wasserbad in 2 ml Flüssig-LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin angezogen. Die Plasmid-DNA-Isolierung erfolgte anschließend mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers.

Die Sequenzierung der Fragmente erfolgte mit dem Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg). Dabei wurden 0.8 bis 1.5 µg an Plasmid-DNA eingesetzt. Als Primer in der PCR-Reaktion wurden die M13-Standard-Sequenzierungsprimer verwendet, wobei der forward Primer mit IRD 700 und der reverse Primer mit IRD 800 markiert war. Die Auftrennung der erhaltenen Fragmente erfolgte auf einem 5,5%igen denaturierenden Polyacrylamidgel (LongRanger-Gel-Lösung, Biozym, Hessisch Oldendorf) mit 41 cm Plattenlänge im Dual-Laser DNA-Sequencer (LI-COR Biosciences) in 0,8 x TBE-Laufpuffer. Die Auswertung der erhaltenen Bandenmuster erfolgte mit der e-Seq-Software (LI-COR) und manueller Nacheditierung. Die Sequenzierung der Fragmente erfolgte für jeden Klon mindestens drei Mal. Alternativ erfolgten Sequenzierungen auch durch die Firma MWG Biotech AG.

### **3.2.7 Auswertung der Sequenzdaten**

Datenbankrecherchen und Sequenzvergleiche wurden über die Internetseiten des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) und des European Bioinformatics Institute (EBI) ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) durchgeführt.

### 3.2.8 Analyse des Cytochrom *b*-Gens mit molekularen Methoden

#### 3.2.8.1 Amplifikation des Cyt *b*-Fragmentes für *P. leucotricha*

Um ein 286 bp langes Fragment des Cytochrom *b*-Gens für das Mehлтаuisolat GB-43K2 zu amplifizieren, wurde mit den Primern RSCBF1 und RSCBR2 (Ishii et al, 2001) (Sequenz siehe Tabelle A2) eine PCR durchgeführt. Die PCR wurde in einem 25 µl Ansatz durchgeführt, in 1x Reaktionspuffer (MBI Fermentas), 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, je 1,0 µM der beiden Primer, teilweise mit 1 U *Pfu*, sonst *Taq* DNA Polymerase (beides MBI Fermentas) und 20 ng Template DNA.

1 x	initiale Denaturierung	95 °C	5 min
35 x	Denaturierung	95 °C	1 min
	Annealing	55 °C	1 min
	Elongation	72 °C	1 min
1 x	Abschluss-Elongation	72 °C	7 min

Die amplifizierte DNA wurde auf einem 1.5 %igen Agarosegel aufgetrennt, das 286 bp Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten, mit dem Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend des Protokolls aufgereinigt, in den Vektor pGemT-Easy ligiert, kloniert und sequenziert. Für den Apfelmehltau wurden die spezifischen Primer PM-COB-for und PM-COB-rev (Tabelle A2) abgeleitet, ausgehend von der Sequenz des 286 bp PCR-Produktes. Die PCR-Bedingungen für dieses Primerpaar entsprachen den oben beschriebenen, mit einer erhöhten Annealing-Temperatur von 58°C. Mit diesen Primern wurde das entsprechende 218 bp große Fragment von DNA der Mehлтаuisolate amplifiziert und sequenziert.

#### 3.2.8.2 CAPS-Analyse

Für die CAPS- (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) Analyse wurden die 218 bp großen amplifizierten Fragmente des Cytochrom *b* (siehe 1.6.8.1) über Microcon Spin Columns (Millipore, Schwalbach) aufgereinigt und mit dem Enzym *Sat*1 (MBI Fermentas, Erkennungssequenz 5'-GC↓NGC-3') verdaut. Dazu wurden mit drei U des Enzymes 200-300 ng DNA in 25 µl of 1 x Puffer G (MBI Fermentas) bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Restriktionsprodukte wurden auf 2% Agarosegelen aufgetrennt.

### **3.3 Statistik**

#### **3.3.1 Auswertung der Markerdaten und Erstellung von Dendrogrammen**

Aus den Markerdaten wurde eine 0/1-Matrix (Anwesenheit/ Fehlen des betrachteten Fragmentes) erstellt. Die weitere Verrechnung der Daten und die Konstruktion eines Dendrogrammes erfolgte mit dem Programm NTSYS 2.1 (Exeter Software, New York, USA). Im SIMQUAL-Modul wurde eine Ähnlichkeits-Matrix (similarity matrix) basierend auf "Jaccard's Coefficient" errechnet. Anschließend wurde eine Clusteranalyse durchgeführt, basierend auf der UPGMA-Methode (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) im SAHN-Modul. Mit dem Graphikmodul TREE wurde das Dendrogramm graphisch dargestellt.

#### **3.3.2 Auswertung Fungizid-Sensitivitätsbestimmungen**

Die Mittelwerte der Keimrate der Konidien wurden zur Kalkulation der Dosis-Wirkungs-Kurven verwendet. Die Daten wurden mittels ANOVA in SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) statistisch ausgewertet. Die Berechnung der ED50-Werte erfolgte nach Kunz et al. (1997).

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Pathogenitätstestung der Pilzisolat auf dem *Malus*-Testsortiment**

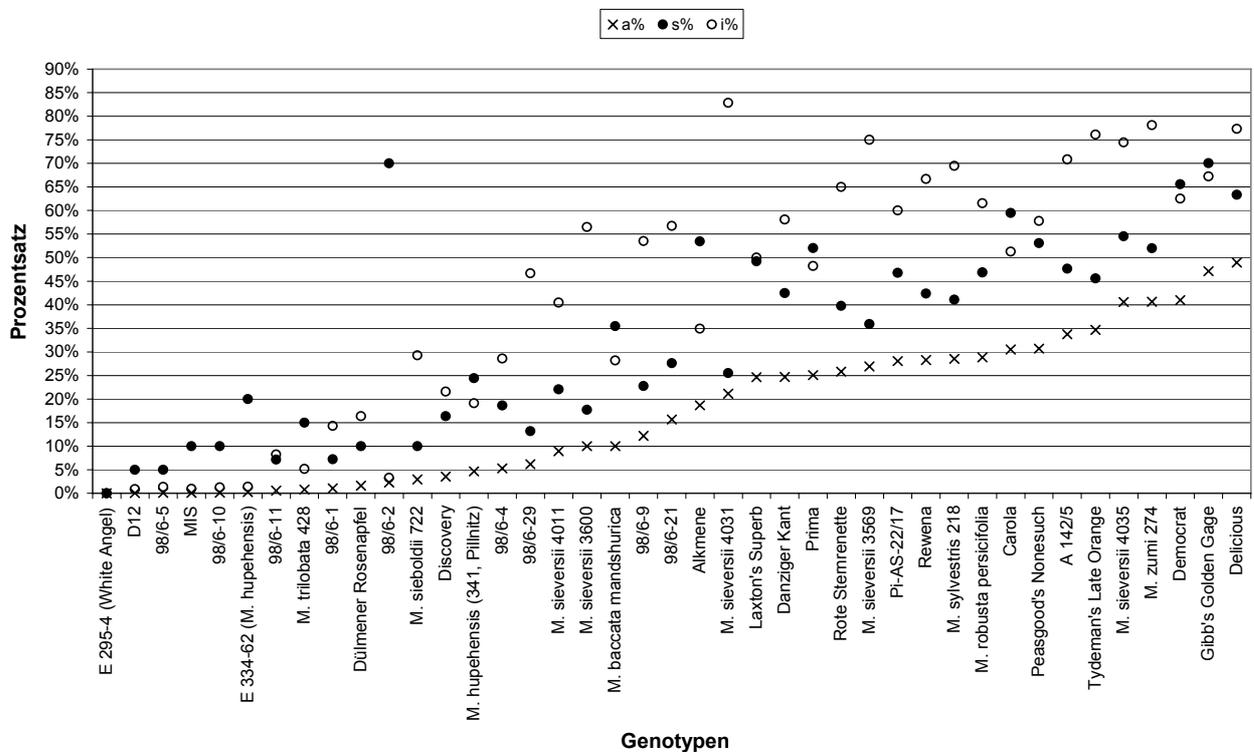
#### **4.1.1 Reaktion der *Malus*-Genotypen auf *P. leucotricha*-Isolate**

In den Pathogenitätstestungen wurden zwölf Apfelmehltau-Isolate auf Blättern von 41 *Malus*-Genotypen inokuliert. Bedingt durch die begrenzte Verfügbarkeit sowohl vom pilzlichen Material als auch vom Blattmaterial der einzelnen Genotypen war die Anzahl der getesteten Blätter nicht konstant. Für die Apfel-Genotypen schwankte die Anzahl der getesteten Blätter zwischen 23 bzw. 26 (*M. sieversii* 3600 bzw. *M. robusta persicifolia*) und 115 (D12); im Durchschnitt wurden 63 Blätter pro Apfel-Genotyp getestet. Für die Isolate wurden zwischen 97 (In6c) und 331 (InA3-21) Blätter pro Isolat getestet. Der Schwerpunkt dieser Arbeit sollte daher nicht auf der quantitativen Analyse der Resistenzquellen liegen, sondern mehr auf einer qualitativen Betrachtung der Pflanzenreaktionen und dem Effekt der Isolate auf das Ausmaß der Infektion.

In Abbildung 2 sind die Reaktionen der *Malus*-Genotypen als Mittelwerte von i% (incidence, prozentualer Anteil der befallenen Blätter), s% (severity, arithmetisches Mittel der prozentualen infizierten Fläche infizierter Blätter) und a% (infected area, Mittelwert der prozentualen infizierten Fläche aller getesteten Blätter) über alle getesteten Apfelmehltau-

Isolate dargestellt, sortiert nach ansteigenden Werten für a%. In der Abbildung deutet sich an, dass die Anzahl der befallenen Blätter (i) und die befallene Blattfläche korreliert sind.

Auch nach Caffier und Parisi (2007) und Jeger et al. (1986) sind "severity" und "incidence" korreliert, daher wird im Ergebnisteil zumeist a% dargestellt (Tabelle 5), da es zudem noch die Blätter mit einbezieht, die nicht befallen sind. Genotypen wurden als anfällig eingestuft, wenn der Mittelwert für a% über alle Isolate höher als 20% war, dies entspricht der Einteilung von Caffier und Laurens (2005), die die durchschnittliche infizierte Fläche als hoch einstufen, wenn sie >20% war. Genotypen, die einen durchschnittlichen a%-Wert von 10-20% erreichten, wurden als moderat anfällig bewertet. Als resistent galten somit Genotypen mit a%-Werten <10, wobei bei Werten von <5 von hochgradig resistent gesprochen werden kann.



**Abbildung 2: Reaktion der *Malus*-Genotypen: Mittelwerte für "incidence" (i%), "severity" (s%) und "infected area" (a%).** Die *Malus*-Genotypen sind ansteigend nach a% (der durchschnittlich befallenen Blattfläche aller Blätter) angeordnet; i% bezeichnet den Anteil befallener Blätter, s% die infizierte Fläche infizierter Blätter.

Die Ergebnisse variierten wie erwartet aufgrund der Auswahl der Genotypen stark. Als hochgradig resistent konnten E295-4 'White Angel', MIS, D12 und Mitglieder der 98/6-Population bestätigt werden (a%=0), die höchste Anfälligkeit zeigten die anfälligen Kontrollen 'Delicious' und 'Gibb's Golden Gage' (a%= 49 und 47).

#### 4.1.1.1 Genotypen mit definierter Resistenz

In den Blatttestungen zeigte sich, dass auch zwischen Genotypen mit den gleichen Resistenzgenen Unterschiede in der Anfälligkeit auftraten (Tabelle 5a).

**Tabelle 5a: Ergebnisse der Blatttestungen von 12 Isolaten auf 41 Genotypen: durchschnittlich befallene Blattfläche (a%); Genotypen mit definierter Resistenz.**

Isolat	Ch9-1-11	F1-12	InA2-15	ChIII-8	ChI-5	InA2-20	InA3-11	InA3-21	Ahr-11	In4f	In6a	In6c	Alle Isolate
Genotyp	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%
A 142/5	35	25	48	41	16	15	30	59	60	31	3		34
98/6-21	32	3	67	8	4	36	18	14		3	0		16
98/6-29	9	3	9	1	15	3		18	3	3	0		6
<i>M. robusta persicifolia</i>	43	35	0	95	15	60			0	8		0	29
98/6-1	5	4	0	0	1	0	2	0	0	0	0		1
98/6-11	2	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
98/6-9	5	1	29	3	1	16	9	39	20	10	2		12
<i>M. zumi</i> 274	31	19	60	67	18	65	18	34		56	22		41
98/6-10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
98/6-2	0	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0		2
98/6-4	4	4	9	0	1	13	13	0	37	3	7		5
98/6-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
D12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MIS	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E 295-4 (White Angel)	0	0		0	0					0			0

dunkelblau: keine Infektion, a%=0

mittelblau: Infektion, aber immer noch als resistente Reaktion betrachtet, a%<10

gelb: Infektion, a%>10

Auffällig war auch ein Unterschied zwischen den ursprünglichen *PI1*-Trägern, A142/5 und *M. robusta persicifolia*. Der Referenzgenotyp für die *PI1*-Resistenz, A142/5, wurde von den getesteten 11 Isolaten infiziert, dabei wurde nur bei 4 Isolaten ein i%-Wert von 100 (also alle getesteten Blätter infiziert, siehe Tabelle A4 Anhang) beobachtet. *M.x robusta persicifolia* wurde dagegen nur von sechs der getesteten zehn Isolate infiziert, jedoch immer mit einem i%-Wert von 100, also waren in den Testungen alle Blätter infiziert. Die Genotypen der 98/6-Population, die laut Markeranalyse nur *PI1* tragen (98/6-21 und -29), waren deutlich weniger anfällig als die beiden ursprünglichen *PI1*-Träger.

Auch bei der *PI2*-Resistenz zeigten sich deutliche Unterschiede in der Anfälligkeit zwischen dem Referenzgenotyp, *M. zumi* 274, und den Mitgliedern der 98/6-Population (98/6-1, -11, -9). Dabei war *M. zumi* 274 mit a%=41 als stark anfällig einzuordnen. Auch hier waren die

Kreuzungsnachkommen aus der 98/6-Population deutlich weniger anfällig, z.T. sogar hochgradig resistent.

Die Genotypen 98/6-2, 98/6-4, 98/6-5 und 98/6-10, die die Resistenzgene *PI1* und *PI2* in Kombination (also pyramidiert) tragen, waren alle über die Mittelung des Befalls der Isolate als resistent einzustufen. Dabei wurden drei der Genotypen (98/6-2, 98/6-5 und 98/6-10) gar nicht oder nur selten (auf einzelnen Blättern kleine Mehltaukolonien) infiziert. Die Ergebnisse für den Genotyp 98/6-4 unterschieden sich deutlich, zehn von elf getesteten Isolaten konnten infizieren, dabei variierten die Werte für *a* zwischen 0-37%.

Die Genotypen mit *Pld*- und *Plmis*-Resistenz (D12 und MIS) waren komplett resistent. Bei beiden war jeweils einmal auf einem einzelnen Blatt eine kleine Infektionsstelle aufgetreten, dies wurde nicht als Versagen der Resistenzeigenschaften bewertet. Der *Plw*-Genotyp E295-4 wurde nur mit 5 Isolaten getestet, da es problematisch war, ausreichend Blattmaterial für weitere Testungen zu gewinnen. Von diesen fünf Isolaten konnte keines infizieren.

#### 4.1.1.2 *Malus*-Wildarten und Sorten ohne definierte Resistenz

Elf *Malus*-Wildarten und 15 Sorten oder Züchtungskclone wurden auf ihre Reaktion gegenüber den zwölf Isolaten des Apfelmehltaus getestet. Bis auf die anfälligen Kontrollen 'Delicious' und 'Gibb's Golden Gage' zeigten diese Genotypen geringe Anfälligkeit oder Resistenz in früheren Feldversuchen und wurden daher ausgewählt, um ihr Potential für die Züchtung zu evaluieren. Zudem sollte die Auswahl an Apfelgenotypen eine Differenzierung der Pilzisolate ermöglichen, durch Unterschiede in der Reaktion auf die verschiedenen Virulenzen der Isolate. Die Ergebnisse der Testungen sind in Tabelle 5b zu finden.

Die anfälligen Kontrollen 'Delicious' und 'Gibb's Golden Gage' zeigten in den Versuchen die höchste Anfälligkeit, mit  $a\%=49$  und  $47$ . Verschiedene Genotypen konnten als resistent bewertet werden, mit variierender Stärke der Resistenz: 'Discovery' ( $a\%=4$ ), 'Dülmener Rosenapfel' ( $a\%=2$ ), E-334-62 ( $a\%=0$ ), *M. baccata mandshurica* ( $a\%=10$ ), *M. hupehensis* ( $a\%=5$ ), *M. sieboldii* ( $a\%=3$ ), *M. sieversii* 3600 ( $a\% = 10$ ), *M. sieversii* 4011 ( $a\%=9$ ) and *M. trilobata* ( $a\%=1$ ). Die übrigen Genotypen wurden, abgesehen vom Genotyp 'Alkmene', der mäßig anfällig war, als anfällig bewertet.

**Tabelle 5b: Ergebnisse der Blatttestungen von 12 Isolaten auf 41 Genotypen: durchschnittlich befallene Blattfläche (a%); *Malus*-Wildarten und Sorten ohne definierte Resistenz**

Isolat	Ch9-1-11	F1-12	InA2-15	ChIII-8	ChI-5	InA2-20	InA3-11	InA3-21	Ahr-11	In4f	In6a	In6c	Alle Isolate
Genotyp	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%	a%
Alkmene	73	90	19	0	50	0	5	3	33	0	0	0	19
Carola	33	17	77	59		17	24	3	90	27	0		31
Danziger Kant	53	0	32	38	0	10	80	2	10	22	5		25
Delicious	33	85	43	90	39	50	53	43	68	55	49	10	49
Democrat	50	20	100	31	0		39	42	50	24			41
Discovery	1	0	10	0	1	0	0	0		0	14	1	4
Dülmener Rosenapfel	5	4	2	0	2	0	0	0	8	0	0		2
E 334-62 ( <i>M. hupehensis</i> )	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gibb's Golden Gage	19	53	63	55	1	92	42	41	57	55	30	6	47
Laxton's Superb	23	40	49	25	26	49	50	15	33	12	13	0	25
<i>M. baccata mandshurica</i>	8	3	58	0	35	7	0	0		0	0		10
<i>M. hupehensis</i> 341	2	5	16	5	0	7	1	11	0	4	0	0	5
<i>M. sieboldii</i> 722	3	6	0	1	10	0	0		1	11	0		3
<i>M. sieversii</i> 3569	40	38	37	38	5	16		58		13	4	10	27
<i>M. sieversii</i> 3600	3	37			3	15					12	4	10
<i>M. sieversii</i> 4011	16	20		20	18	7	1	10		0	1	0	9
<i>M. sieversii</i> 4031	13	43		23	15	10	33	10	100	0	5	11	21
<i>M. sieversii</i> 4035	21	60	50	68	30		17	0	100	90	30		41
<i>M. sylvestris</i> 218	48	20	63	23	11		26	7	72	8			29
<i>M. trilobata</i> 428	0	2	0	4	0	0	0		0	0	0	0	1
Peasgood's Nonesuch	13	40	51	40	0		57	38	48	17	0	0	31
Pi-AS-22/17	41	23	34	36	3	35	0	25	60	19			28
Prima	58		3	0	6	0	0	0	85	18	44	84	25
Rewena	28		51		0	47	33	28	0	4	32	15	28
Rote Sternrenette	33	5	83	5	0	21	40	25	40	22	15		26
Tydemans Late Orange	38	20	35	54	53	54	27	47	23	35	10	30	35

dunkelblau: keine Infektion, a%=0

mittelblau: Infektion, aber immer noch als resistente Reaktion betrachtet, a%<10

gelb: Infektion, a%>10

#### 4.1.2 Aggressivität der Apfelmehltau-Isolate

Die getesteten Isolate variierten stark hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die verschiedenen *Malus*-Genotypen zu infizieren. Dabei setzt sich die Aggressivität, mit der ein Isolat seine Wirtspflanze schädigen kann, aus verschiedenen Faktoren zusammen. In dieser Arbeit werden die Pathogenität (die Fähigkeit, einen Wirts-Genotyp zu infizieren; Infektion ja oder nein) und die Virulenz (das Ausmaß der Infektion, dargestellt durch a%) betrachtet. Tabelle 6

gibt eine Zusammenfassung der Anzahl an *Malus*-Genotypen mit kompatibler (infiziert) und inkompatibler (resistent) Reaktion. Diese Anzahlen repräsentieren den Grad an Pathogenität. Die detaillierten Ergebnisse finden sich in Tabelle A3 im Anhang.

**Tabelle 6: Pathogenität der Apfelmehltau-Isolate in Prozent infizierter Genotypen und Virulenz in durchschnittlich befallener Blattfläche a%.** Zusammengefasst dargestellt sind die Ergebnisse der Pathogenitätstestungen. Da die Anzahl untersuchter Genotypen bei den unterschiedlichen Isolaten variierte wurde der prozentuale Anteil infizierter Genotypen bestimmt.

Isolate	Ch9-1-11	F1-12	InA2-15	ChIII-8	ChI-5	Ahr-11	InA2-20	InA3-11	InA3-21	In4f	In6a	In6c
Infizierte Genotypen	35	30	27	27	26	21	22	22	22	21	10	4
nicht infiziert	6	9	10	12	14	12	14	14	14	19	26	16
nicht untersucht	0	2	4	2	1	8	5	5	5	1	5	21
% infizierte Genotypen	85	77	73	69	65	64	61	61	61	53	28	20
Durchschn. a%	20	13	29	18	11	29	21	19	17	16	10	9

Das chinesische Isolat Ch-9-1-11 konnte 85% aller Genotypen die größte Anzahl Genotypen infizieren. Für die anderen Isolate variierte der Prozentsatz infizierter Genotypen, zwischen 77% für F1-12 und 53% für In4f. Die Isolate In6a und In6c konnten nur 28 und 20% der getesteten Genotypen infizieren. In6c wurde nur auf etwa der Hälfte der verwendeten Genotypen getestet, trotzdem sind die Ergebnisse ähnlich zu denen von In6a. Beide Isolate wurden aus der selben Knospe isoliert, trotzdem scheinen sie unterschiedliche Pathogenitätseigenschaften zu haben, denn sie konnten unterschiedliche *Malus*-Genotypen infizieren. Die Isolate InA2-20, InA3-11 und InA3-21 konnten zwar die gleiche Anzahl an Genotypen infizieren, aber auch diese unterschieden sich im Spektrum der infizierten Genotypen.

Ein weiterer Faktor, der zur Beurteilung der Aggressivität eines Isolates herangezogen werden kann, ist das Ausmaß der Erkrankung auf Genotypen, die infiziert werden können, die Virulenz des Isolates. Dabei wird hier die Virulenz durch die durchschnittlich befallene Blattfläche aller Genotypen (a%, letzte Zeile Tabelle 6) ausgedrückt. Auch darin unterscheiden sich die Isolate. Es konnte keine Korrelation zwischen Anzahl infizierter Genotypen und Stärke des Befalls festgestellt werden.

#### 4.1.3 Reaktion der *Malus*-Genotypen mit definierter Resistenz auf Mehltauisolat

Ein wichtiges Ziel in den Untersuchungen war es, die Dauerhaftigkeit der definierten Resistenzen zu bewerten, d. h. festzustellen, ob unter den verwendeten Isolaten solche

waren, die die Resistenzen überwinden können. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Fähigkeit der einzelnen Isolate, die Genotypen mit definierten Resistenzen zu infizieren.

**Tabelle 7: Reaktion der *Malus*-Genotypen mit definierter Resistenz auf Mehltausisolate.**

Isolat	<i>Pld</i>	<i>Plmis</i>	<i>Plw</i>	<i>PI1</i>	<i>PI2</i>	<i>PI1+PI2</i>
Ch9-1-11	-	-	-	+	+	-
F1-12	-	-	-	+	+	-
InA2-15	-	-	-	+	+	- (+: 98/6-2, 98/6-4)
ChIII-8	-	-	-	+	+	-
ChI-5	-	-	-	+	+	-
Ahr-11	-	-	-	+	n.a.	- (+: 98/6-4)
InA2-20	-	-	-	+	+	- (+: 98/6-4)
InA3-11	-	-	-	+	+	- (+: 98/6-4)
InA3-21	-	-	-	+	+	-
In4f	-	-	-	+	+	-
In6a	-	-	-	-	+	- (+: 98/6-4)
In6c	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

+: Infektion

-: keine Infektion

n.a.: nicht untersucht (not analysed)

Aus der Tabelle wird deutlich, dass die Resistenzgene *Pld*, *Plmis* und *Plw* von dem hier verwendeten Isolatspektrum unbeeinträchtigt weiterhin wirksam sind, keines der getesteten Isolate konnte eine Infektion auf diesen Genotypen etablieren. Die Genotypen mit den Resistenzgenen *PI1* und *PI2* dagegen werden von fast allen getesteten Isolaten infiziert, die Resistenzen bieten also keinen wirksamen Schutz mehr. In Kombination dagegen schützen *PI1+PI2* die Pflanzen zumeist (bis auf 98/6-4) weiterhin erfolgreich.

## 4.2 Molekularbiologische Methoden zur Differenzierung von Mehltausisolaten

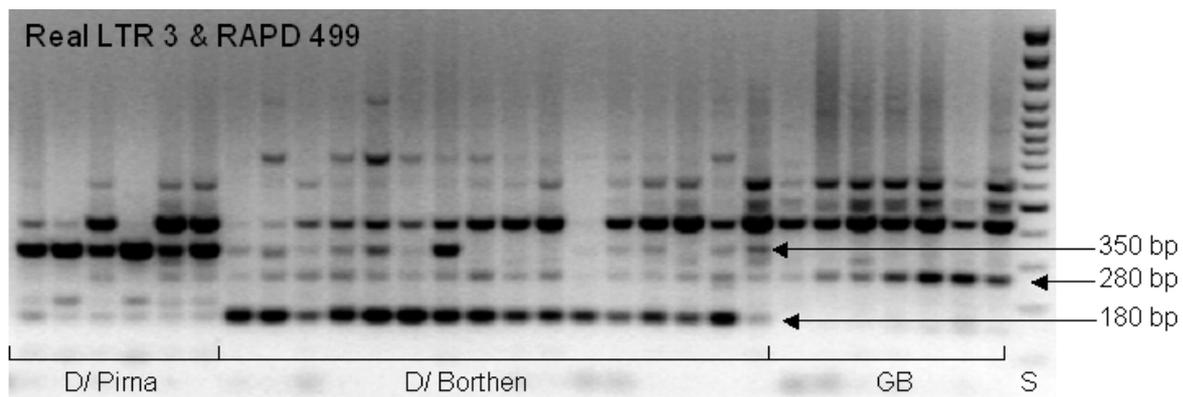
### 4.2.1 Entwicklung und Anwendung molekularer Marker

#### 4.2.1.1 Mehltauspezifischer PCR-Marker PM-33

Ziel der Untersuchungen war es, eine große Anzahl Proben von Apfelmehltau-infizierten Blättern aus verschiedenen Herkünften mit molekularen Markern zu testen, um Informationen über die genetische Variabilität des Pathogens zu erhalten. Daneben sollten auch die Apfelmehltau-Isolate in Kultur in die Analysen mit einbezogen werden. Zur Kontrolle, ob in den DNA-Proben, die von infiziertem Freilandmaterial gewonnen wurden, auch eine ausreichende Menge an pilzlicher DNA für PCR-Analysen vorhanden war, wurde parallel zu den Markeranalysen eine PCR mit dem apfelmehltauspezifischen Primerpaar PM33 durchgeführt. Bei Anwesenheit des 500 bp großen Fragmentes konnte davon ausgegangen werden, dass pilzliche DNA in ausreichender Menge und Qualität vorlag. Nur Proben, in denen für den PM33 Marker eine deutliche Bande vorlag, wurden in den weiteren Markeranalysen (RAPD und AFLP-SCAR) ausgewertet, die Anzahl der Proben betrug 225.

#### 4.2.1.2. RAPD LTR3- RAPD499

Mit der Primerkombination LTR3 und RAPD499 konnten bei den untersuchten Apfelmehltauprobe drei Polymorphismen detektiert werden. Es wurde die Anwesenheit oder das Fehlen von Banden von 180 bp, 280 bp und 350 bp unabhängig voneinander bewertet (0/ 1-Matrix). Abbildung 3 zeigt exemplarisch die Ergebnisse für eine Auswahl von Feldproben. Für die Auswertung der Feldproben und Isolate wurden die Daten für diese Marker mit den Daten für die AFLP-SCARs kombiniert.



**Abbildung 3: RAPD-Primer-Kombination LTR3 & RAPD499** Gekennzeichnet sind die drei ausgewerteten Banden bei 180 bp, 280 bp und 350 bp. Dargestellt ist eine Auswahl Feldproben aus Deutschland (D) und Großbritannien (GB).

#### 4.2.1.3 Mikrosatelliten (SSRs, Simple Sequence Repeats)

Die Ergebnisse der Anreicherung und der Erstellung der partiellen genomischen Bank sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Nach PCR-Vorselektion sollte ein Viertel der Klone ein Fragment mit einem Mikrosatellitenmotiv enthalten. Es wurden 159 in Vorselektion positive und 15 negative Klone sequenziert. Durch die Sequenzierung wurde nur für 81,8% der 159 in der Vorselektion positiven Fragmente ein Mikrosatellitenmotiv nachgewiesen. Die weitere Bearbeitung ergab, daß von den 135 SSR-enthaltenden Sequenzen nur 13 zur Ableitung von Primern geeignet waren. Als Mikrosatellitenmotiv wurden Sequenzen mit Anzahl der Wiederholungen  $n \leq 3$  gezählt, die Anzahl der Nukelotide war mindestens 2, die längste Basenabfolge war GTGTTA ( $n=12$ ).

**Tabelle 8: Ergebnisse der Anreicherung von Mikrosatellitenmotiven in einer partiellen genomischen Bank des Apfelmehltau**

Klone in partieller genomischer Bank		1039	100%		
davon mit SSR nach PCR Vorselektion		262	25,2%		
Sequenzierte Klone	Σ	mit SSR		ohne SSR	
Vorselektion positiv	159	130	81,8%	29	18,2%
Vorselektion negativ	15	5	33,3%	10	66,6%
Gesamt	174	135	77,6%	39	22,4%
geeignet für Primer		13	7,5%		
nicht geeignet für Primer	93	SSR zu nah am Rand, Fragment zu kurz			
	33	andere Gründe			

Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Motive der gefundenen Mikrosatellitensequenzen. Etwa 60% der Motive (102) entsprachen den in der Anreicherung verwendeten Motiven, die verbleibenden ca. 40% (65) sind jedoch Motive, die nicht zur Anreicherung verwendet wurden. Die Gesamtzahl der Klone mit Mikrosatellitenmotiv und die Gesamtzahl der aufgefundenen Mikrosatelliten stimmen nicht überein, da in vielen Fragmenten mehr als ein Mikrosatellitenmotiv gefunden wurde (21,1%). Tabelle 9 gibt auch eine Übersicht über die Anzahl der Wiederholungen und damit die Länge der Mikrosatellitenmotive in den sequenzierten Fragmenten. Die Mehrzahl der Fragmente enthielt Mikrosatellitenmotive mit bis zu 20 Wiederholungen, jedoch wurden auch einige Fragmente (23,3%) mit mehr Wiederholungen gefunden. Häufigstes Motiv war AC/CA (56 mal), gefolgt vom Trinukleotid ACC/CCA (48 mal).

**Tabelle 9: Mikrosatellitensequenzen: Motive in der partiellen genomischen Bank**

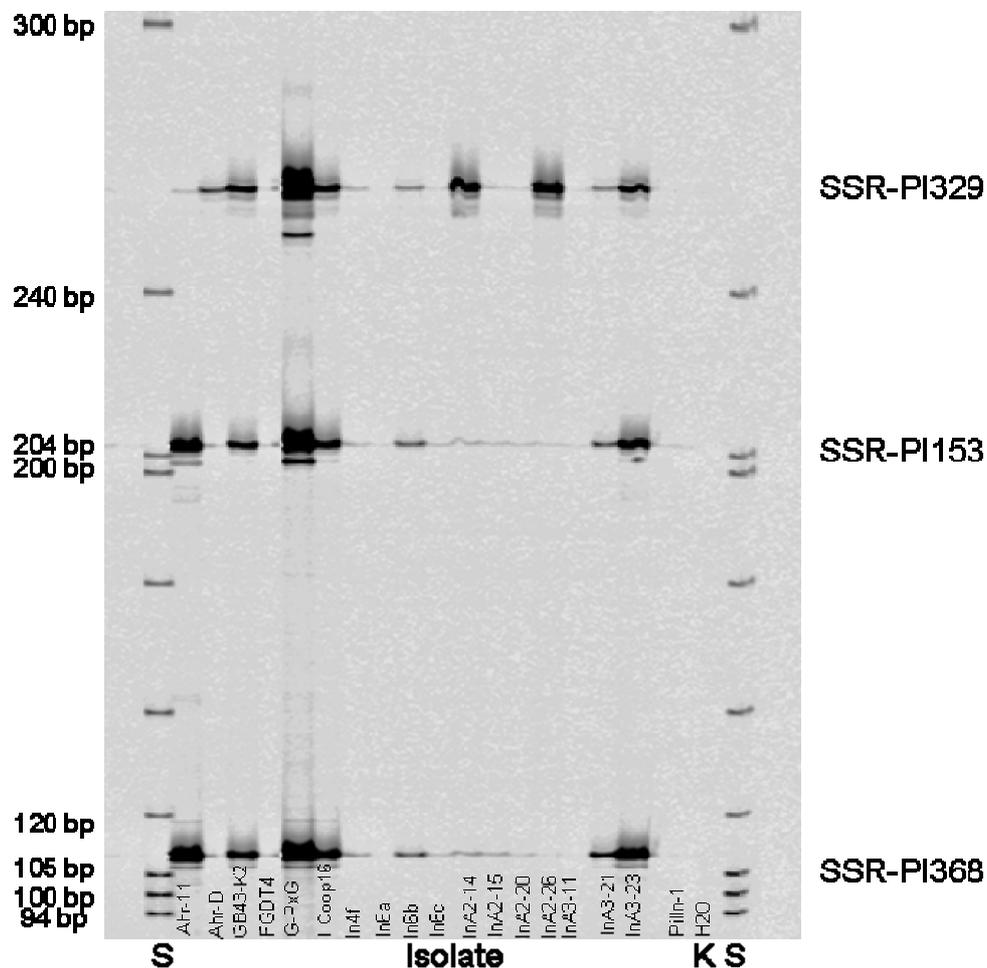
Mikrosatelliten-Sequenz	Anreicherungs-Pool	Anzahl Auftreten				Σ	
		n ≤ 5	n ≤ 10	n ≤ 20	n > 20		
CT/ TC	Pool 1	2	9	11	8	30	Σ: 102
AAT/ TAA	Pool 1	0	0	0	0	0	
AC/ CA	Pool 2	5	12	13	26	56	
AAG/ GAA	Pool 2	0	12	1	3	16	
AAC/ CAA	Pool 2	0	0	0	0	0	
ACC/ CCA	nicht verwendet	5	35	7	1	48	Σ : 65
TCC/ CCT	nicht verwendet	1	2	1	1	5	
Weitere	nicht verwendet	7	4	1	0	12	
Σ		20	74	34	39	167	

Nur 13 der Fragmente erwiesen sich als geeignet, um Primer zur Amplifikation der Mikrosatellitenmotive abzuleiten, jedoch konnten nur mit 5 dieser Primerpaare Fragmente der erwarteten Größe für Proben der reinen Mehлтаuisolate amplifiziert werden. Diese Primerpaare sind in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10: Entwickelte Mikrosatelliten-Primer**

Primerpaar	SSR-PI153	SSR-PI273	SSR-PI329	SSR-PI368	SSR-PI393
Wiederholungstyp	(AAG) <sub>8</sub>	(ACC) <sub>5</sub> , (CCT) <sub>6</sub>	(AG) <sub>6</sub>	(GAT) <sub>7</sub>	(AG) <sub>16</sub> , (CT) <sub>14</sub>
Erwartete Fragmentgröße	207 bp	289 bp	263 bp	110 bp	208 bp

Bei Testung der Primer mit DNA von 20 Mehltausisolaten und einer Auswahl von Feldproben konnte kein Polymorphismus detektiert werden. Eine Zusammenstellung von jeweils zwei (PI273 und PI393) bzw. drei Primerpaaren (PI153, PI329 und PI393) in einer Multiplex-PCR-Reaktion mit dem QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen) war erfolgreich, alle zwei bzw. drei erwarteten Fragmente wurden amplifiziert. In Abbildung 4 sind Ergebnisse für die SSR-Primer PI329, PI153 und PI368 in Multiplex-Reaktion exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 4: SSR-Primer PI329, PI153 und PI368 in Multiplex-Reaktion** Dargestellt sind die Ergebnisse für eine Auswahl von Isolaten. Bei allen Primerpaaren konnten keine Polymorphismen detektiert werden. S bezeichnet jeweils den Größenstandard, K die Kontrollreaktion mit Wasser anstelle von DNA.

Eine solche Multiplex-Kombination verschiedener Marker kann bei Testung großer Probenanzahlen Arbeit, Zeit und Material sparen, wurde jedoch aufgrund fehlender Polymorphismen nicht für die Feldproben angewendet.

#### 4.2.1.4 AFLP-Analysen

Für die AFLP-Analyse der Mehltausolate wurde das ursprüngliche Protokoll so abgewandelt, dass eine geringere Menge an Ausgangs-DNA eingesetzt werden konnte (50 ng statt 300 ng). Zudem wurde die Anzahl selektiver Basen pro Primerkombination auf +2/+2 reduziert, um die Anzahl der Fragmente pro Primerkombination zu erhöhen (James et al., 2003). Pro Primerkombination konnten im Durchschnitt etwa 90 Fragmente ausgewertet werden. Es wurden insgesamt 5 Primerkombinationen verwendet und es war möglich, für 20 der Isolate 58 polymorphe Marker auszuwerten (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Anteil polymorpher AFLP-Marker an auswertbaren Banden**

<b>AFLP-Primerkombination</b>	<b>auswertbare Banden</b>	<b>ausgewertete Polymorphismen</b>
E-AA + M-AA	101	6
E-AA + M-AC	83	4
E-AA + M-CA	120	10
E-AA + M-CC	69	12
E-AC + M-AA	109	26

Da in den 20 Isolaten nur ein chinesisches enthalten war, wurden weitere 7 chinesische Isolate analysiert. Die AFLP-Analyse erwies sich aufgrund von Geräteproblemen als schwierig, jedoch konnten für die 27 Isolate 17 der 58 Marker ausgewertet werden (siehe Tabelle A4 Anhang).

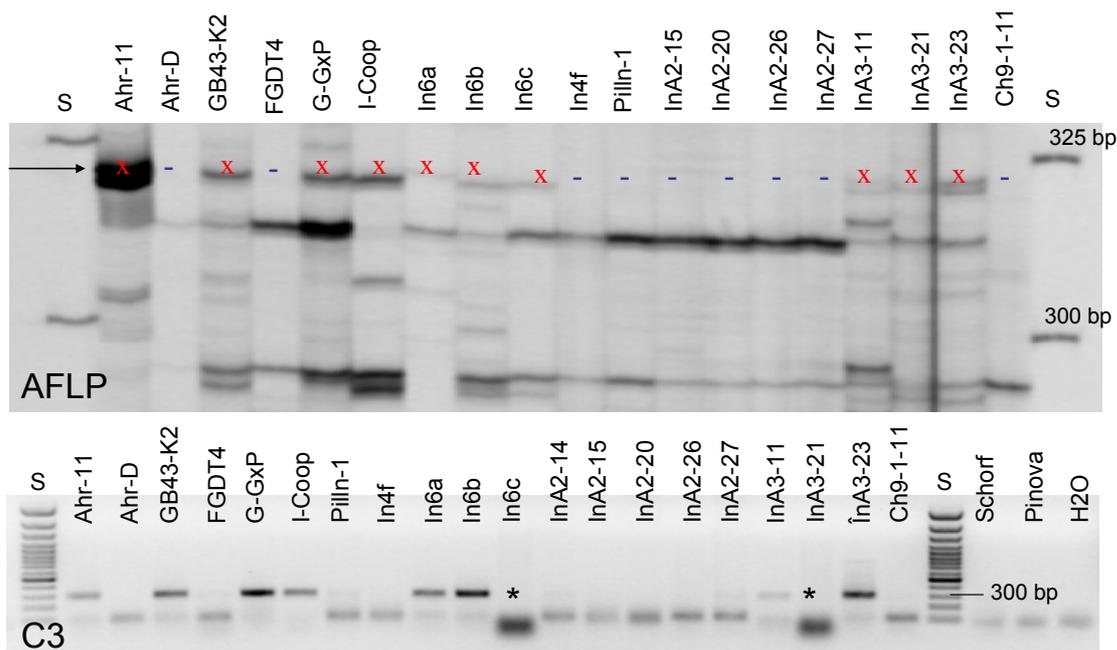
#### 4.2.1.5 AFLP-SCARs

Elf polymorphe Fragmente aus der AFLP-Analyse der Isolate wurden aus Polyacrylamidgelen ausgeschnitten, reamplifiziert und sequenziert. Es konnten keine nennenswerten Ähnlichkeiten zu Sequenzen in Datenbanken gefunden werden. Von den erhaltenen Sequenzen wurden geeignete Primer abgeleitet und es konnten zwei spezifische, polymorphe Marker (SCAR, Sequence Characterised Amplified Region) für den Apfelmehltau entwickelt werden (Tabelle 12).

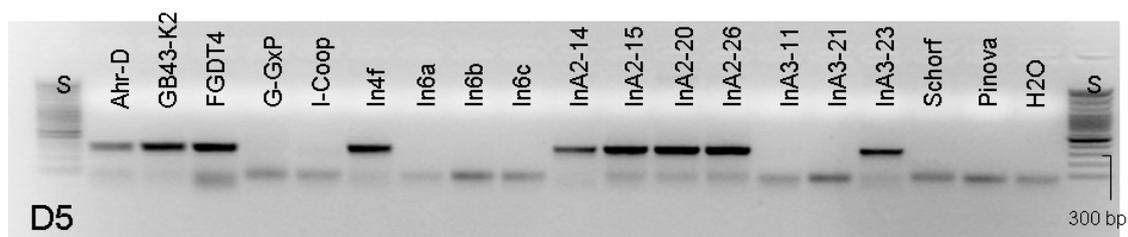
**Tabelle 12: Entwickelte AFLP-SCAR-Marker**

Marker	isoliert von Isolat	AFLP-Primerkombination	Fragmentgröße
C3	I-Coop 16	E-AC + M-CC	321 bp
D5	Ahr-D	E-AC + M-CA	330 bp

In Abbildung 5a sind die Original-AFLP-Fragmente des C3-AFLP-SCAR exemplarisch dargestellt, darunter ihre Entsprechung im C3-Marker; in Abbildung 5b ist der D5-SCAR-Marker für ausgewählte Isolate zu sehen.



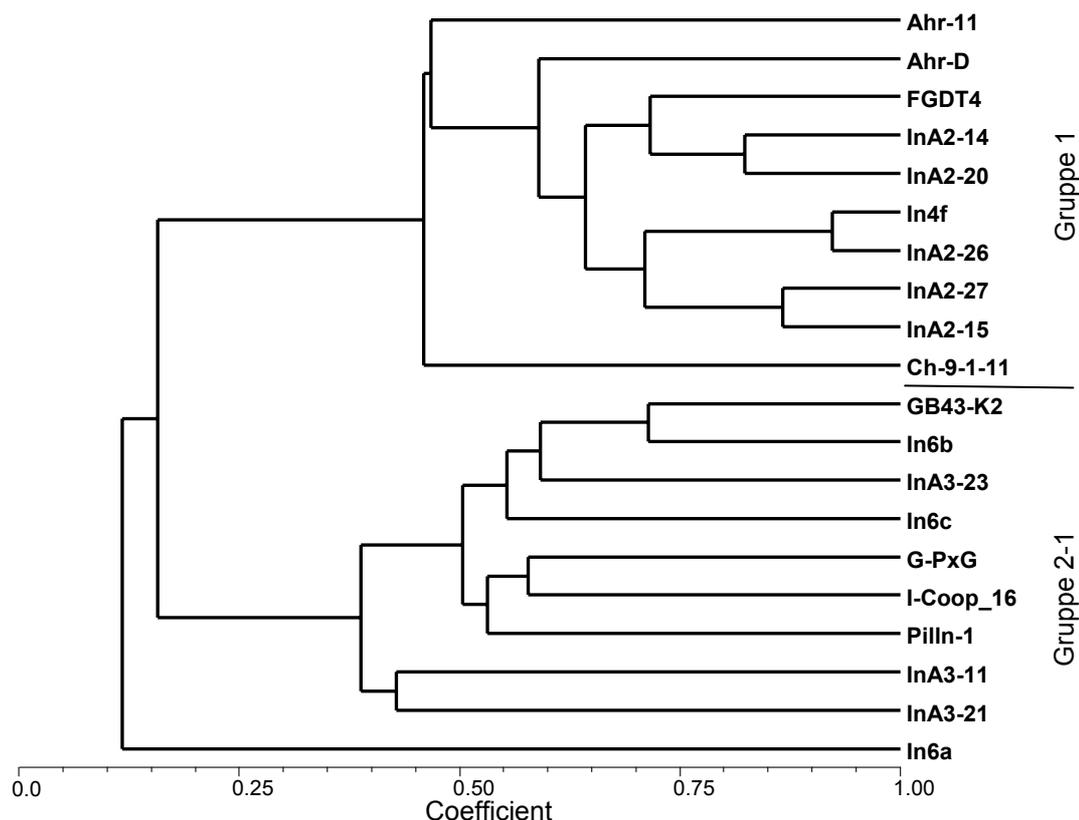
**Abbildung 5a: AFLP-Marker für ausgewählte Isolate und ihre Entsprechung im C3-SCAR-Marker** Dargestellt sind die Bandenmuster für verschiedene Isolate. Der \* in der Abbildung kennzeichnet Isolate, bei denen für den C3-SCAR die PCR ausgefallen war. In anderen PCR-Reaktionen trat bei diesen Isolaten die C3-SCAR-Bande auf.



**Abbildung 5b: D5-SCAR-Marker für ausgewählte Isolate** Dargestellt sind die Bandenmuster für verschiedene Isolate.

#### 4.2.2 Erstellung von Dendrogrammen basierend auf Markerdaten

Es wurden verschiedene Dendrogramme für Mehltau-Isolate und -Feldproben erstellt. Für 20 der 29 Mehltausolate (Tabelle 3a) war es möglich, 58 polymorphe AFLP-Marker zu detektieren. Diese wurden in einem Dendrogramm mit den zwei AFLP-SCAR-Markern und den drei RAPD-Markern der Primerkombination LTR3 und RAPD499 kombiniert (siehe Abbildung 6), es wurden somit 63 Marker ausgewertet.

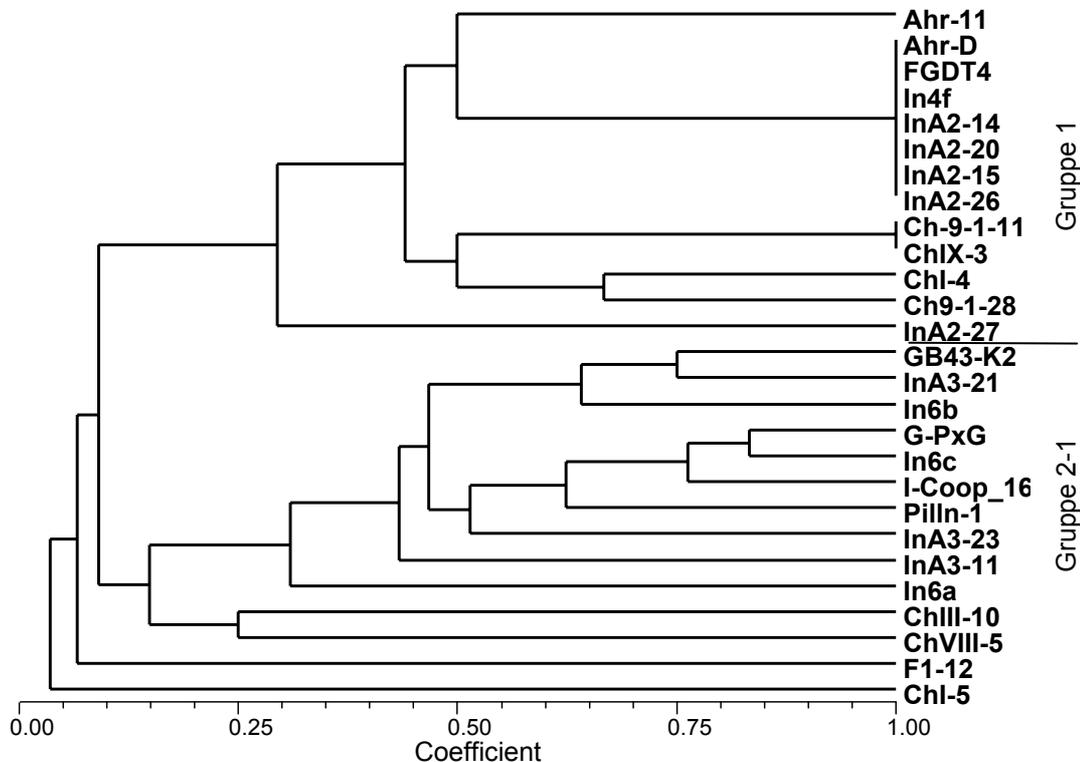


**Abbildung 6: Dendrogramm für 20 Mehltausolate basierend auf 63 Markern**

Das Dendrogramm unterteilt die Isolate in zwei Hauptgruppen oder Cluster. In beiden Gruppen (Gruppe 1 und Gruppe 2-1) sind sowohl europäische, als auch indische Isolate vorhanden. Es konnte nur ein chinesisches Isolat in diese Analyse miteinbezogen werden. Verschiedene Isolate wurden von jeweils gleichen Knospen isoliert (InA2-14, -15, -20, -26, -27; InA3-11, -21, -23; In6a, b, c). Diese unterschieden sich hinsichtlich ihrer Markerdaten, waren jedoch jeweils im selben Cluster eingeordnet. Eine Ausnahme stellt das Isolat In6a dar, es ist außerhalb der Cluster eingeordnet.

Für 27 Isolate wurde ein weiteres Dendrogramm erstellt, basierend auf den Daten von 17 AFLP-Markern (siehe Abbildung 7, Tabelle A4). In diesem Dendrogramm sind auch die

meisten chinesischen Isolate enthalten. Die zwei chinesischen Isolate ChIII-8 und ChIV-7 konnten nicht in die Markeranalyse miteinbezogen werden. In diesem Dendrogramm konnten nicht alle 58 AFLP-Marker verwendet werden, da die Auswertung aufgrund der Gelqualität nicht möglich war.



**Abbildung 7: Dendrogramm für 27 Mehltausisolate basierend auf 17 Markern.**

Im Dendrogramm der Abbildung 7 ist keine vergleichbar deutliche Unterteilung in zwei Hauptgruppen zu finden, da die Trennung der Gruppen zu nah an der Wurzel des Dendrogrammes auftritt. Vergleicht man jedoch die Clusterbildung mit dem 63 Marker x 20 Isolate-Dendrogramm, ist zu erkennen, dass die bereits vorhandenen europäischen und indischen Isolate prinzipiell vergleichbar eingeordnet sind (Gruppen 1 und 2-1). Die chinesischen Isolate verteilen sich auf die beiden unterschiedlichen Gruppen, zwei der chinesischen Isolate (F1-12, ChI-5) sind außerhalb der Gruppen platziert.

Ein weiteres Dendrogramm wurde basierend auf den Markerdaten der drei RAPD-Marker und zwei AFLP-SCAR-Marker für 225 Feldproben und 19 Isolaten erstellt (hier nicht dargestellt, Ergebnisse in Tabelle 13 zusammengefasst).

Es erfolgte wieder eine klare Aufteilung in zwei Hauptgruppen, die der Einteilung im 63 Marker x 20 Isolate-Dendrogramm entspricht, einzige Ausnahme ist Isolat InA3-23. Eine der beiden Hauptgruppen ist in diesem Dendrogramm in zwei Untergruppen (2-1 und 2-2) unterteilt, wobei in einer dieser Untergruppen (2-2) nur Feldproben und keine Isolate eingeordnet sind. Insgesamt konnten die Proben in 24 Haplotypen (mit jeweils gleichen Markern) eingeteilt werden. Hauptgruppe 1 enthielt neun Haplotypen, Untergruppe 2-1 neun Haplotypen, und Untergruppe 2-2 sechs Haplotypen. Bei der Verteilung der Feldproben ist kein deutlicher Zusammenhang zwischen Mitgliedern einer Gruppe ersichtlich. Zwar finden sich häufig Proben von einem Standort in einer Gruppe, es gibt jedoch auch viele Abweichungen. Eine Korrelation zwischen Zuordnung zu einer Gruppe und Primär- oder Sekundärbefall oder anderen Kriterien ließ sich nicht finden.

**Tabelle 13: Gruppeneinteilung von *P. leucotricha*-Isolaten und Feldproben basierend auf 3 Dendrogrammen**

Gruppe	20 Isolate 63 Marker	27 Isolate 17 Marker	225 Feldproben + 19 Isolate, 5 Marker
<b>1</b>	Ahr-11 Ahr-D FGDT4 In4f InA2-14 InA2-15 InA2-20 InA2-26 InA2-27 Ch9-1-11	Ahr-11 Ahr-D FGDT4 In4f InA2-14 InA2-15 InA2-20 InA2-26 InA2-27 Ch9-1-11 Ch9-1-28 Ch-IX-3 Ch-I-4	Ahr-11 Ahr-D FGDT4 In4f InA2-14 InA2-15 InA2-20 InA2-26 InA2-27 InA3-23* Feldproben
<b>2-1</b>	GB43-K2 G-GxP I-Coop 16 Pilln-1 In6b In6c InA3-11 InA3-21 InA3-23	GB43-K2 G-GxP I-Coop 16 Pilln-1 In6a In6b In6c InA3-11 InA3-21 InA3-23 ChIII-10 ChVIII-5	GB43-K2 G-PxG I-Coop 16 In6a In6b In6c InA3-11 InA3-21 Feldproben
<b>2-2</b>			nur Feldproben
<b>außerhalb</b>	In6a	ChI-5 F1-12	

\*: InA3-23 hier in anderer Gruppe!

In Tabelle 13 sind die in den Dendrogrammen erkennbaren Hauptgruppen dargestellt. Auch hinsichtlich der Aggressivität der Isolate war keine Korrelation zu der Einteilung in die

Gruppen zu finden. Auffällig war, dass in Gruppe 1 eine deutlich höhere Homogenität zwischen den Isolaten herrschte als in Gruppe 2. Von 63 Markern im ersten Dendrogramm hatten die zehn Isolate in Gruppe 1 45 Marker gemeinsam, die neun Isolate in Gruppe 2 jedoch nur 7. Entsprechend stimmten im zweiten Dendrogramm 12 von 17 Markern der 13 Isolate in Gruppe 1 überein, in Gruppe 2 hatten die 12 Isolate keinen Marker gemeinsam. Eine Kombination der Daten für die verschiedenen Marker/ Probenanzahlen in einem einzigen Dendrogramm ließ sich nicht durchführen, da die dann fehlenden Daten für die verschiedenen Proben (missing values) die Berechnung verändern würden und ein völlig anderes Dendrogramm das Ergebnis wäre.

### **4.3 Untersuchungen zur Fungizidresistenz von Mehltausisolaten**

#### **4.3.1 Molekularbiologische Methoden**

##### 4.3.1.1 Entwicklung spezifischer Primer für das Cytochrom *b*-Gen von *Podosphaera leucotricha*

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden von Lesemann et al. (2006) bereits veröffentlicht. Ziel der Untersuchungen war es, einen molekularen Marker zu entwickeln, mit dessen Hilfe eine mögliche Mutation im Cytochrom *b*-Gen des Apfelmehltau nachgewiesen werden konnte. Mit dem Primerpaar RSCBF1 und RSCBR2 konnte mit Gesamt-DNA des Isolates GB-43K2 ein einzelnes 286 bp großes Fragment des Cytochrom *b*-Gens von *P. leucotricha* amplifiziert werden. Sequenzvergleiche mit dem Cytochrom *b*-Gen anderer pilzlicher Pathogene ergaben hohe Homologien, z. B. mit dem Getreidemehltau *Blumeria graminis* (e-Wert  $5e-58$ ), dem Apfelschorf *Venturia inaequalis* (e-Wert  $9e-35$ ), und dem Reisbrand *Magnaporthe grisea* (e-Wert  $4e-49$ ). Dieses Fragment umfasst die kodierende Sequenz für die Aminosäuren an den Positionen 129 (Phenylalanin) und 143 (Glycin), die bei Mutation und Änderung zu einer anderen Aminosäure eine Strobilurinsensitivität in pilzlichen Pathogenen bedingen können. In Abbildung 8 sind die Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der oben genannten Pathogene mit denen des Apfelmehltau dargestellt. Der Vergleich der Aminosäuresequenz von *P. leucotricha* (Isolat GB-43K2) mit dem entsprechenden Protein von *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* zeigte 89% Identität, die Aminosäureidentitäten mit den Proteinen von *Venturia inaequalis* und *Magnaporthe grisea* betragen 87%.

Von der 286 bp langen Sequenz des Cytochrom *b*-Fragmentes wurden spezifische Primer für *P. leucotricha* abgeleitet, die ein 218 bp Fragment amplifizierten (PM-COB-Primer, siehe Tabelle A2). Auf diesen basierend wurden weitere spezifische Primer entwickelt (in Tabelle A2, PM-SNP-for, PM-SNP-C-rev und PM-SNP-G-rev), mit denen die SNP-Mutation (Single

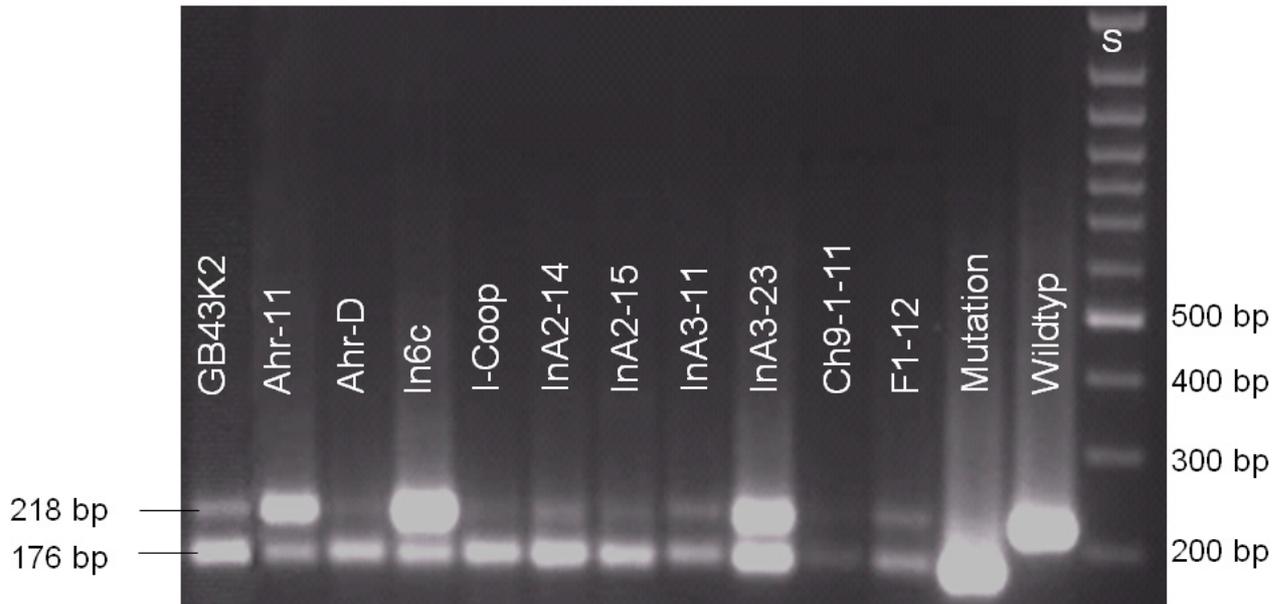
Nucleotide Polymorphism) detektiert werden kann. Beide reverse-Primer führen in Kombination mit dem forward-Primer zu einem Fragment von 222 bp und unterscheiden sich nur in einer Base. Dabei sind sie so spezifisch, dass nur die jeweilige Form (Wildtyp G oder Mutation C) amplifiziert wird. Für die Analyse des Apfelmehltaus eignen sich die Primer jedoch nicht, da in allen getesteten Isolaten beide Formen auftraten, sodass auch beide Primer ein Produkt liefern. Daher wird auf diese Primer nicht näher eingegangen. Anhand von Versuchen mit Bakterienklonen, die jeweils ein Fragment der verschiedenen Formen enthielten, konnte die Spezifität der Primer aber bestätigt werden. Daher wurden PCR-Analysen für 36 Isolate mit den PM-COB-Primern durchgeführt und CAPS-Marker entwickelt (eine Auflistung der verwendeten Isolate findet sich in Kapitel 3.1.3 und Tabelle 3).

			129		143	
B.g.t._sen	85	TASAFFFLVYLHIGRGLYGYGSYRAPRTLVTIGTVIFILMIVTAF LGYVLPYGQMSHW			GATVITNLMSAIPW	156
B.g.t._res	85	.....			A.....	156
M.g.	85	.....I.....A.....L..MAIG.....L..A.....I.....				156
V.i.	85	.....I..M.....L.VI.....L..G.....				156
P.l. Ahr-11-133	85	.....V.....MA.....L..A.....				156
P.l. GB-43K2-3	85	.....V.....MA.....L..A.....				156
P.l. F1-12-153	85	.....I.....A.....				156
P.l. In6c-66	85	.....KS.....T.A..T..L.V.....G.....				156
P.l. In6c-71	85	.....H.....G.....				156

**Abbildung 8: Sequenzvergleich der partiellen Aminosäuresequenzen des Cytochrom *b*-Genes der verschiedenen phytopathogenen Pilze *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (B.g.t.); *Magnaporthe grisea* (M.g.); *Venturia inaequalis* (V.i.) und *Podosphaera leucotricha* (P.l.); sen: sensitives Isolat; res: resistentes Isolat von *B. graminis*.**

#### 4.3.1.2 CAPS-Analyse von 36 Mehлтаuisolaten auf die G143A-Mutation im Cytochrom *b*-Gen

Als eine weitere, unabhängige Methode zur Detektion des G143A-Austausches wurden CAPS-Analysen mit 36 Isolaten durchgeführt (siehe Abbildung 9). Die PCR-Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *Sat1* verdaut. Dieses Enzym hat die Erkennungssequenz 5'-GCNGC-3', und lässt daher das Wildtyp-Fragment (5'-GGTGC-3') unverdaut (Abbildung 10, Nukleinsäurevergleich). Cytochrom *b*-Fragmente, die die Mutation tragen, werden hydrolysiert, und es entstehen zwei Fragmente von 176 und 42 bp. Alle getesteten Isolate zeigten sowohl das unverdaute 218 bp Fragment, als auch das größere 176 bp Produkt des Restriktionsverdaus (Abbildung 9). Das kleinere 42 bp Fragment war in den meisten Proben nicht sichtbar, bedingt durch eine unzureichende Färbung der geringen DNA-Menge.



**Abbildung 9: CAPS-Analyse mit dem Enzym *Sat1* von einer Auswahl von Mehltausisolaten und Kontroll-Plasmid-DNA.** Dargestellt sind die Bandenmuster für eine Auswahl von Isolaten und jeweils Kontroll-Plasmid-DNA mit und ohne Schnittstelle (Mutation und Wildtyp).

Die Intensität der *Sat1*-verdauten und unverdauten Bande ist ein Indikator für die Häufigkeit der G143A-Mutation. Die CAPS-Analyse des Isolates GB-43K2 zeigte ein stärkeres 176 bp Fragment, somit scheinen höhere Anzahlen von G143A-mutierten Mitochondrien vorhanden zu sein. Im Vergleich dazu war u.a. bei den Strobilurin-sensitiven Isolaten Ahr-11 und In6c die 218 bp Bande stärker. Parallele Restriktion mit dem Enzym *Alu1*, welches nicht zwischen Wildtyp und mutierter Sequenz unterscheidet, läßt ausschließen, dass die DNA nicht komplett verdaubar war (Daten nicht gezeigt). Als weitere Kontrolle wurden auch PCR-Fragmente von Plasmid-DNA, die entweder die Mutation oder die Wildform des Fragmentes enthielt, mit in die Analysen einbezogen (Abbildung 9). Die CAPS-Analysen bestätigten die Sequenzierungsdaten und zeigten Heteroplasmie für das mitochondriale Cytochrom *b*-Gen in allen getesteten Isolaten.

#### 4.3.1.3 Klonierung und Sequenzierung des *P. leucotricha* spezifischen Cytochrom *b*-Fragmentes für ausgewählte Mehltausolate

Für vier Referenzisolate wurde das Apfelmehltau-spezifische Cytochrom *b*-Fragment (amplifiziert mit dem PM-COB-Primerpaar) kloniert, einzelne Kolonien selektiert, vermehrt und sequenziert (GB-43K2: 21 Sequenzen; Ahr-11: 4 Sequenzen; In6c: 18 Sequenzen und F1-12: 4 Sequenzen). Für weitere 15 Isolate wurde das Fragment direkt, d. h. ohne Klonierung, sequenziert. Die Sequenzanalysen von 47 klonierten Cytochrom *b*-

Genfragmenten der vier Referenzisolate GB-43K2, Ahr-11, F1-12 und In6c zeigten insgesamt 47 Nukleinsäureunterschiede, die zu insgesamt 13 Aminosäureaustauschen führten. Die Nukleotidaustausche waren über die gesamte Sequenz der verschiedenen Klone verteilt. Es konnten insgesamt acht verschiedene Sequenztypen in Wiederholungen gefunden werden (Abbildung 10, Nukleinsäurevergleich). Einer der aufgetretenen Nukleinsäurewechsel befindet sich am zweiten Nukleotid an der Aminosäureposition 143 (Abbildung , Pfeil), welche in Hefe und verschiedenen phytopathogenen Pilzen verantwortlich für eine auftretende Strobilurininsensitivität ist.

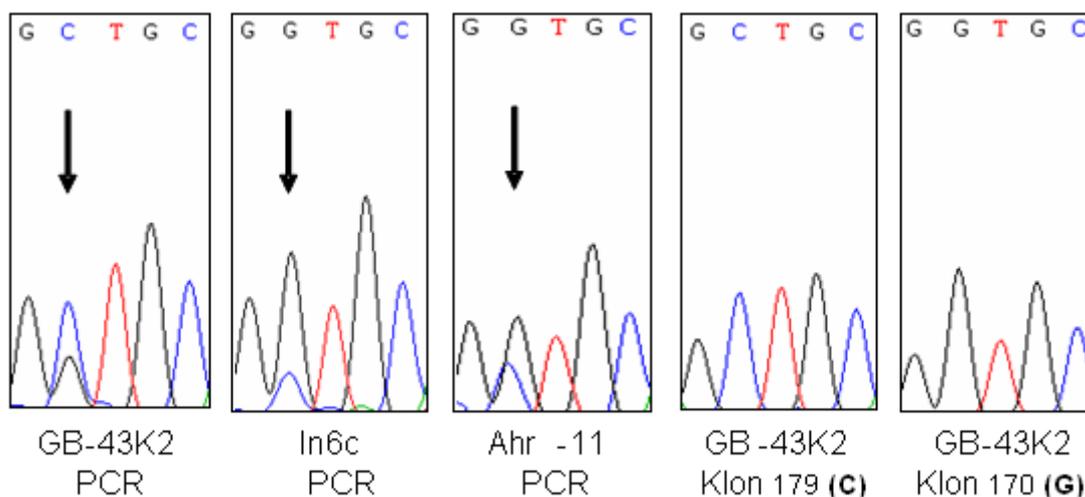
GB-43K2-2	1 ACAGCTTCAGCTTTCTTCTTTTTAGTGTACTTACACATAGGAAGAGGTTTATACTACGGATCTTACAGAGCACCAAGAACA
GB-43K2-3	1 .....C..T....C.....T.....G..A.....
GB-43K2-186	1 .....T..C.....T.....T.....
F-1-12-153	1 .....T..T.....T.....T.....T.A.T.....
In6c-66	1 .....T..T.....T.....T.....T.A.T.....
In6c-67	1 .....T..T.....T.....T.....T.A.T.....
In6c-71	1 .....T..T.....T.....T.....T.A.T.....
In6c-84	1 .....T..T.....T.....T.....T.A.T.....
GB-43K2-2	TTAGTATGAACAATAGGTGTGGTAATTTTATATTAATGATGGCTACAGCTTTCTTTGGGTTATGTTTTACCGTACGGTCAA
GB-43K2-3	.....T.....T.....T.....C..A.....C.....A.....G...
GB-43K2-186	C.....G.....AACT.....C..T..A.....C.....T..T.....
F-1-12-153	.....AC.....G.T.....AACAA..T.....A...G.T.....T..A.....A.....T..T.....
In6c-66	.....AC.....G.T.....AACAA..T.....A...G.T.....T..A.....A.....T..T.....
In6c-67	.....AC.....G.T.....AACAA..T.....A...G.T.....T..A.....A.....T..T.....
In6c-71	.....AC.....G.T.....AACAA..T.....A...G.T.....T..A.....A.....T..T.....
In6c-84	.....AC.....G.T.....AACAA..T.....A...G.T.....T..A.....A.....T..T.....
	↓
GB-43K2-2	ATGAGTTTTATGAGCTGC AACAGTTATTACTAACCTTATGAGTGCAATACCATGAAT.218
GB-43K2-3	...TCA.....G.....T.....T.....218
GB-43K2-186	.....C.....G.....T.....218
F-1-12-153	.....T..C.....218
In6c-66	.....G...C.....T.....218
In6c-67	.....G...T.....T.....218
In6c-71	.....G...T.....T.....218
In6c-84	.....G...T.....T.....218

**Abbildung 10: Sequenzvergleich 47 klonierter Cytochrom *b*-Fragmente der *P.I.*-Isolate Ahr-11, GB-43K2, F1-12 und In6c** Der Pfeil zeigt die Nukleinsäureposition an, deren Austausch von G nach C die G143A-Mutation bewirkt. Unterstrichen ist die Erkennungssequenz des Restriktionsenzymes *Sat1* (5'-GC↓NGC-3'), welches bei Mutation von G nach C schneidet. Die angegebenen Klone sind Beispiele für die auftretenden Nukleinsäuremuster.

Die anderen beobachteten Wechsel befinden sich an Positionen, die nicht mit einer Fungizidresistenz in Verbindung gebracht wurden, und es konnte in dieser Arbeit keine Korrelation zwischen diesen Austauschen und Fungizidresistenz gefunden werden. Der Aminosäureaustausch von Phenylalanin zu Leucin (F129L), der auch für Fungizidresistenz verantwortlich gemacht wird, wurde in diesen Analysen nicht gefunden.

In allen direkt sequenzierten PCR-Produkten von Gesamt-DNA verschiedener Isolate wurden zwei überlappende Peaks für Guanin (G) und Cytosin (C) an der Nukleotidposition

gefunden, die für die Aminosäureposition 143 codiert. Dabei entspricht G dem Wildtyp und C der Mutation der G143A (Abbildung 10, Pfeil). Im Elektropherogramm des Trifloxystrobin-resistenten Isolates GB-43K2 ist der C-Peak höher, im Gegensatz dazu zeigten die Strobilurin-sensitiven Isolate Ahr-11 und In6c einen höheren G-Peak. Um zu zeigen, dass die sich überlagernden Peaks in den Sequenzierungsreaktionen tatsächlich Heteroplasmie anzeigen, wurden auch klonierte Fragmente des Isolates GB-43K2 sequenziert, und diese korrespondierten entweder zum Wildtyp oder zur Mutanten. Im Gegensatz zu den Sequenzen, die von PCR-Produkten direkt sequenziert wurden, gab es, wie zu erwarten, in den klonierten Sequenzen keine sich überlagernden Peaks (siehe Abbildung 11, Vergleich GB-43K2 Klon C und GB-43K2 Klon G).



**Abbildung 11: Elektropherogramm des für die G143A-Mutation relevanten Ausschnittes der *Podosphaera leucotricha* Cytochrom *b*- Nukleotidsequenz**  
 Dargestellt sind die Sequenzen der PCR-Fragmente der Isolate GB-43K2, In6c und Ahr-11 und einzelner Klone des Isolates GB-43K2, welche entweder den Wildtyp (GB-43K2 Klon G) oder die mutierte Sequenz repräsentieren (GB-43K2 Klon C). Die Pfeile markieren überlappende Peaks an der Nucleotidposition, die für die G143A stehen.

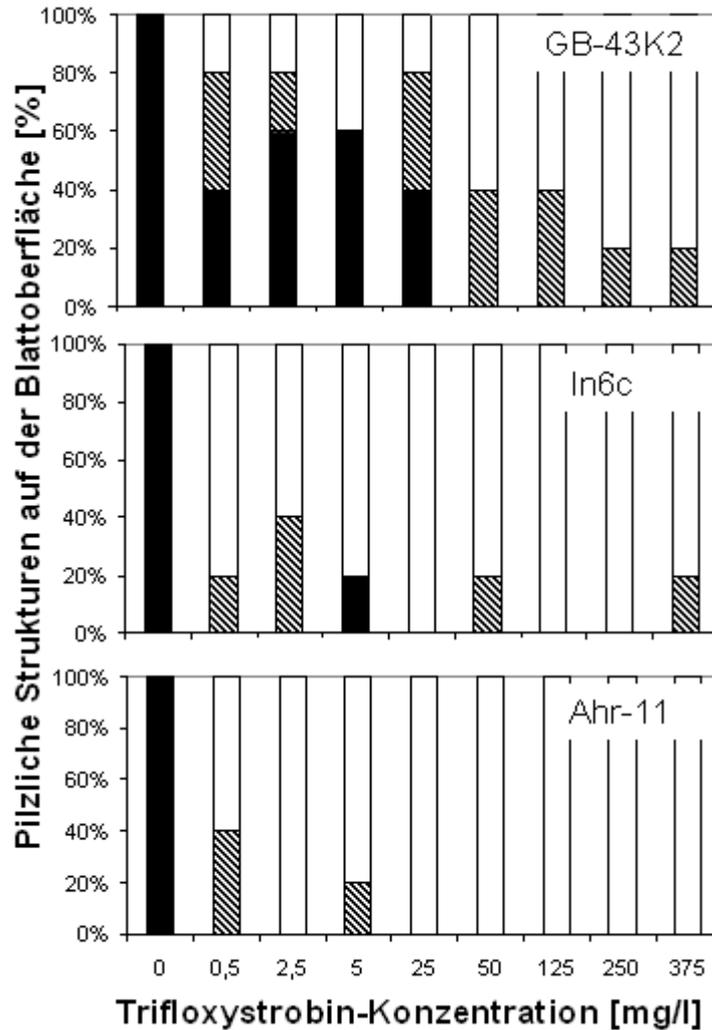
Die Sequenzierung von 21 klonierten PCR-Fragmenten des Trifloxystrobin-resistenten Isolates GB-43K2 lässt vermuten, dass ca. 50% der Fragmente die Mutation tragen, die zur Aminosäureposition A143 korrespondiert. Interessanterweise zeigten die 18 Sequenzen des Strobilurin-sensitiven Isolates In6c nur Wildtypsequenzen. Dies lässt vermuten, dass die Mehrheit der Mitochondrien dieses Isolates in der Wildform vorliegen. Dies stimmt mit den oben genannten Ergebnissen überein.

#### 4.3.2 Analyse der Fungizidsensitivität von Mehltausisolaten in Blatttestungen und Sporenkeimtests

Nachdem die G143A-Mutation im Cytochrom *b*-Gen bei Isolaten des Apfelmehltau nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, in wie weit sich diese in der Reaktion auf ein Strobilurin-Fungizid auswirkt. Die Isolate GB-43K2, In6c und Ahr-11 wurden als Referenzisolate ausgewählt und hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber dem Strobilurin-Fungizid Trifloxystrobin untersucht. Die Ergebnisse des Sporenkeimtests und des Blatt-Infektions-Assays sind in Abbildung 13 und Abbildung 14 dargestellt.

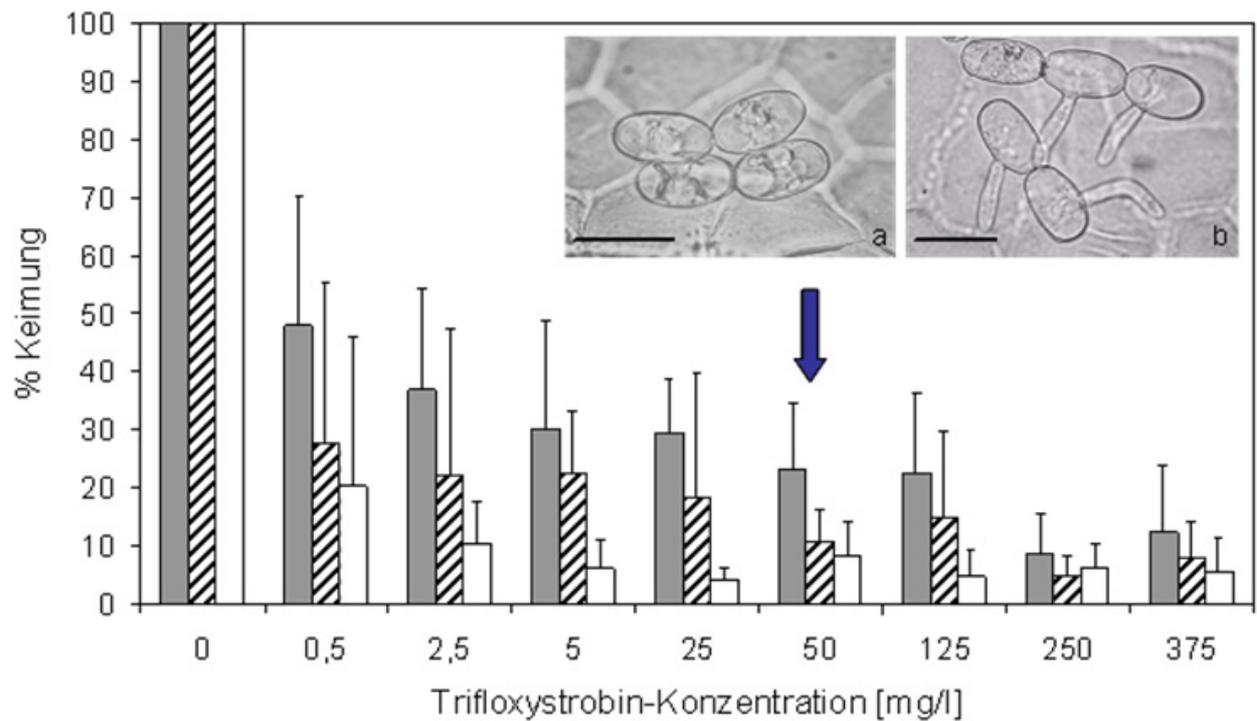
Um zu untersuchen, ob die Fungizidsensitivität eines Isolates in Infektionsversuchen deutlich gemacht werden kann, wurden *in vitro* angezogene Apfelblätter mit ansteigenden Fungizidkonzentrationen behandelt und mit den Isolaten GB-43K2, In6c und Ahr-11 inokuliert. Diese Isolate haben unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber Trifloxystrobin in Sporenkeimtests gezeigt. Auf unbehandelten Kontrollblättern bildete sich bei allen drei Isolaten deutliches Myzel mit Konidiophoren, an denen sich lange Ketten von Konidien entwickelten (Abbildung 12).

Bis zu einer Konzentration von 5 mg Trifloxystrobin/ l bildete das Isolat In6c zwar Konidiophoren, aber nur selten mit Konidien. Das Isolat Ahr-11 zeigte keine Keimung bei höheren Konzentrationen. Unter Fungizidstress zeigten diese beiden Isolate eher inkonsistente Keimraten und bei der empfohlenen Aufwandmenge für die Feldanwendung von Trifloxystrobin im Apfelanbau (50 mg/ l) war bei beiden Isolaten keine Sporulation zu beobachten. Isolat GB-43K2 dagegen bildete bei Feldkonzentration Myzel und Konidiophoren, Konidienbildung wurde nur gelegentlich beobachtet. Bei dieser Konzentration konnten Sporen des sensitiven Isolates Ahr-11 nicht mehr keimen und die Blattoberfläche wurde nicht infiziert. Bei einer Konzentration von 375 mg Trifloxystrobin/ l zeigte Isolat GB-43K2 immer noch Myzelwachstum, jedoch ohne Konidiophoren. Wie erwartet konnten die Isolate Ahr-11 und In6c nicht auf Apfelblättern wachsen, die mit dieser Fungizidkonzentration behandelt waren (Abbildung 12).

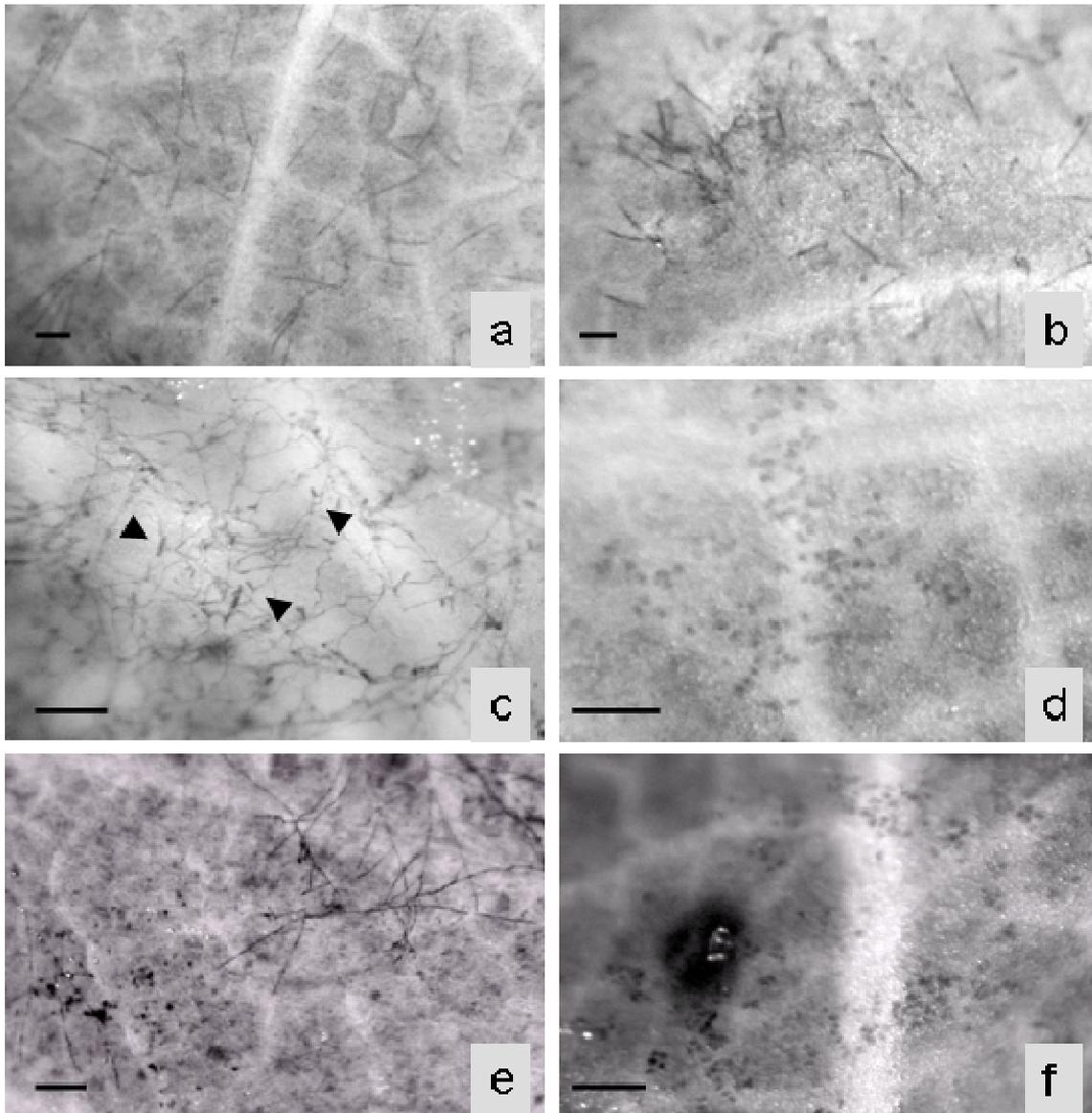


**Abbildung 12: Wirkung des Strobilurin-Fungizides Trifloxystrobin auf die pathogene Entwicklung verschiedener Apfelmehltau-Isolate auf *in vitro* kultivierten Apfelblättern**  
 Fungizid-behandelte Blätter wurden mit Konidien der Isolate GB-43K2, In6c, und Ahr-11 inokuliert und die pilzliche Entwicklung wurde nach 21 Tagen bewertet. Schwarze Säulen repräsentieren Blätter mit starker Produktion von Konidienketten; gestreifte Säulen repräsentieren Myzelwachstum mit Bildung von Konidiophoren, aber ohne Konidienbildung; weiße Säulen zeigen an, dass kein pilzliches Wachstum auftrat. Die Werte repräsentieren Zählungen von 10 Blättern.

Sporenceimtests in Gegenwart ansteigender Fungizidkonzentrationen (Abbildung 13) zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Isolaten GB-43K2, In6c und Ahr-11. Sporen wurden als gekeimt bewertet, wenn die Keimschlauchlänge mindestens die Länge des betreffenden Konidiums erreicht hatte (Abbildung 13, Vergleich Insertionen a und b).



**Abbildung 13: Dosis-Wirkung-Beziehungen des Strobilurin-Fungizides Trifloxystrobin auf die Keimung von Konidien verschiedener Apfelmehltau-Isolate** Konidien der Isolate GB-43K2 (graue), In6c (gestreifte) und Ahr-11 (weiße Säulen) wurden auf isolierte Kutikeln inokuliert. Nach zwei Tagen wurde der Anteil gekeimter Sporen bestimmt, indem 9 Wiederholungen von 200 Sporen pro Kutikel gezählt wurden. Die Insertionen zeigen ungekeimte (a) und gekeimte Konidien (b). Größenstandart: 2,5 µm. Der Pfeil zeigt die empfohlene Aufwandmenge für Trifloxystrobin im Feld an.



**Abbildung 14: Wachstum der Isolate GB-43K2 (a, c, e) und Ahr-11 (b, d, f) unter Einfluß von Strobilurin** a) und b) Wasserkontrolle: Bildung von langen Konidienketten; c) GB-43K2, 50 mg/l a.i., Bildung von Myzel mit Konidienträgern (Pfeilspitzen); d) Ahr-11, 50 mg/l a.i., ungekeimte Konidien; e) GB-43K2, 500 mg/l a.i.: Myzelwachstum; f) Ahr-11, 500 mg/l a.i.. Größenmaßstab: 10 µm.

Die mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 14 a-f) verdeutlichen diese Ergebnisse für die Isolate GB-43K2 (a, c, e) und Ahr-11 (b, d, f). Bei der mit Wasser behandelten Kontrolle (a, b) bilden beide Isolate Sporenträger mit langen Konidienketten aus. Bei einer Konzentration von 50 mg/l Trifloxystrobin können die Sporen des Isolates Ahr-11 bereits nicht mehr keimen (d), GB-43K2 entwickelt dagegen noch deutliches Myzel mit Konidiophoren, es werden jedoch keine Konidien gebildet (c). Bei 500 mg/l Trifloxystrobin zeigt Isolat GB-43K2 immer noch Myzelwachstum, für Sporen des Isolates Ahr-11 ist die Keimung nicht mehr möglich.

Ein Vergleich der Mittelwerte (Tukey-Test) ergab eine signifikant höhere Keimrate bei Isolat GB-43K2 im Vergleich zu Ahr-11 ( $p < 0,0001$ ) und In6c ( $p = 0,026$ ). Signifikante Unterschiede in den Sensitivitäten spiegeln sich in den berechneten  $ED_{50}$  Werten von 0,385 mg/ l, 0,0132 mg/ l, und 0,00243 mg/ l für die Isolate GB-43K2, In6c, und Ahr-11 wider. Bei der empfohlenen Feldkonzentration von 0,05 g Trifloxystrobin/ l (Abbildung, Pfeil) wurden Fungizideffizienzen zwischen 80 (GB-43K2) und 92% (Ahr-11) gefunden.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Phytopathologische Charakterisierung von *Podosphaera leucotricha* und Bewertung der Resistenz in der Gattung *Malus* gegenüber verschiedenen Isolaten des Apfelmehltau**

#### **5.1.1 Pathogenität der Mehltausolate**

Zwölf Isolate des Apfelmehltau wurden auf einem Sortiment von 41 verschiedenen *Malus*-Resistenzträgern, -Wildarten und -Sorten inokuliert, um die Pathogenität und Virulenz der Isolate zu charakterisieren. Das Testsortiment umfasste Genotypen mit einer großen genetischen Diversität, wobei der Schwerpunkt auf Genotypen mit verschiedenen Resistenzen lag. Damit sollte ermöglicht werden, ein großes Spektrum der vorhandenen Avirulenzgene im Pathogen deutlich zu machen, denn ausgehend von der Gen-für-Gen-Hypothese werden die Avirulenzgene im Pathogen in den Resistenzgenen im Wirt widergespiegelt (Dangl und Jones, 2001; Jørgensen, 1988; McDonald and Linde, 2002; McDowell and Woffenden, 2003). Bei den Testungen hat sich gezeigt, dass sich die Mehltausolate alle unterscheiden und eine breite Variabilität an Pathogenität und Virulenz aufweisen. Da keine zwei Isolate in ihrem Infektionsvermögen identisch waren, d.h. die selbe Auswahl an Genotypen infizieren konnten, kann man vom Vorhandensein von differentieller Resistenz im Wirt und damit korrespondierender Virulenz in den Pathogen-Isolaten ausgehen (Koch et al., 2000).

Das Testsortiment beinhaltete auch Genotypen, für die das Vorhandensein von Major-Resistenzgenen belegt ist. Diese Resistenz konnte für die Gene *Pld*, *Plmis* und *Plw* als vollständig wirksam bestätigt werden, keines der Isolate verfügte über die entsprechenden Virulenzen. Anders waren dagegen die Ergebnisse für *PI1*- oder *PI2*-resistente Pflanzen: die meisten Mehltausolate konnten eine kompatible Reaktion mit diesen Pflanzen eingehen und man spricht von der Fähigkeit der Isolate, die Resistenz zu "brechen" oder zu überwinden. Eine Reihe von *Malus*-Genotypen im Testsortiment waren Nachkommen einer Kreuzung zwischen einem *PI1*- und einem *PI2*-Träger, die zum Ziel hatte, beide Resistenzgene zu vereinen ("pyramidisieren") und damit die Pflanzen dauerhafter zu schützen. Die meisten

dieser Kreuzungsnachkommen erwiesen sich tatsächlich als weniger anfällig als die Resistenzdonoren. Eine nähere Betrachtung findet sich in Kapitel 5.1.4..

In dieser Arbeit wurden überwiegend Isolate aus Asien für die Virulenztestungen verwendet. Betrachtet man die Herkunft der Mehltausolate, ist kein Zusammenhang zwischen ihrer Pathogenität oder ihrer Virulenz festzustellen. Isolate von allen Ursprungsorten waren fähig, die *PI1*- und *PI2*-Resistenzen zu überwinden und variierten in der Stärke der Infektion, unabhängig von ihrem geographischen Ursprung. Alle verwendeten Isolate wurden aus Anlagen gewonnen, die Teil von gartenbaulichen Forschungsstationen sind und es ist nicht ganz klar, in welchem Umfang die definierten Mehltairesistenzen dort im Umfeld in Wildarten oder Züchtungsmaterial vorhanden sind. Allerdings wurden die Proben von Anlagen mit Sorten genommen und nicht von Züchtungsklonen, so dass der Selektionsdruck auf die vorhandene Mehltaupopulation, der zur Vermehrung virulenter Rassen führen kann, nicht sehr hoch sein konnte. Auch für den Roggenbraunrost (*Puccinia recondita* f.sp. *secalis*) wurde beschrieben, dass an Standorten, an denen eine große Auswahl an Resistenzen im Wirt präsent ist, eine erhöhte Anzahl Virulenzgene zu finden ist. Im Falle des Braunrostes betraf dies Standorte, in deren Nähe seit längerem Resistenzzüchtung gegen den Braunrost betrieben wird, sowie ein Versuchsfeld, auf dem über drei Jahre hinweg ein Differentialsortiment für Braunrost kultiviert wurde (Klocke, 2004). Das Vorhandensein von Resistenzgenen kann sich somit unter Umständen auch in relativ kurzer Zeit auf die Virulenzstruktur einer Pathogenpopulation auswirken. Caffier und Laurens (2005) berichteten, dass sich das Mehltauinokulum in einem Versuchsfeld in Angers, Frankreich, mit etwa 400 Bäumen mit dem *PI2*-Resistenzgen in nur 10 Jahren nach der Pflanzung von avirulent zu virulent gewandelt hat. Andere Mehltau-Major-Resistenzgene waren dort auch in Pflanzen präsent, mit 20 Bäumen 'White Angel' (*Plw*), acht Bäumen von MIS-Selektionen (*Plmis*) und 18 Bäumen, die von *M. x robusta* 5 (*PI1*) abstammten. Der Selektionsdruck für *PI2* war in dem Versuchsfeld damit deutlich erhöht. Verglichen mit der Situation in Frankreich, wo hunderte von Bäumen mit der selben Resistenz vorhanden waren, stammten die Isolate in dieser Arbeit von Anlagen mit vergleichsweise geringem Selektionsdruck, besonders für zwei Major-Resistenzen gleichzeitig, kombiniert in einer Pflanze. Somit stellt sich die Frage, wieso die Virulenzen für beide Major-Resistenzen in diesen Isolaten vorhanden waren.

Dabei wird davon ausgegangen, dass die Sporen des Apfelmehltau zwar mit dem Wind über weite Strecken verbreitet werden können, wie für Getreidemehltau und andere pilzliche Pathogene gezeigt wurde (Aylor, 1986). Jedoch wird beim Apfelmehltau entsprechend dem Rebenmehltau *Erysiphe necator* von einer tatsächlich eher geringen Kapazität der Windverbreitung über weite Strecken ausgegangen (Delye et al., 1995). Mehltaupilze auf mehrjährigen Gehölzen produzieren in der Regel sehr viel weniger Sporen als Mehltaupilze

auf einjährigen und krautigen Pflanzen. Daher ist die Gesamtmenge an abgegebenen Sporen sehr viel geringer (Clarke and Akhkhya, 2002) und die erfolgreiche Verbreitung von überlebensfähigen Sporen über weite Strecken reduziert. Für den Apfelmehltau sind die Verbreitungswege nicht näher untersucht. Eine Verbreitung von einzelnen Genotypen über weitere Strecken ist aber nicht auszuschließen und könnte eine Erklärung für das Vorhandensein von "ungenutzten" Virulenzen sein. Limpert und Bartoš (2002) sehen die Anhäufung verschiedener Virulenzen (und damit auch ungenutzter Virulenzen) in Pathogenen in Abhängigkeit von einer natürlichen Verbreitung der Pathogene mit den vorwiegend auftretenden Westwinden. Danach steigt die Virulenzkomplexität in Pathogenpopulationen in Richtung Osten (also von Europa nach Asien) an. Für den Weizenmehltau wurde beschrieben, dass der Theorie entsprechend viele Resistenzgene ihren Ursprung in verschiedenen Regionen Asiens haben. Auch viele der Resistenzgene gegen den Apfelmehltau haben ihren Ursprung in Asien. Für genauere Aussagen über diese Theorie sind aber nicht ausreichend Informationen über die tatsächliche Verteilung von Virulenzen verfügbar.

Eine Begründung für das Auftreten der kombinierten Virulenzen könnte die Vermehrungsform des Apfelmehltau sein. *P. leucotricha* hat ein gemischtes Reproduktionssystem, das heißt, dass sowohl sexuelle als auch asexuelle Vermehrung stattfinden. Die Bedeutung der sexuellen Phase für das Pathogen ist unbekannt (Berwith, 1936; Coyier, 1974), jedoch haben Gessler et al. (2000) in Untersuchungen mit RAPD-Markern eine hohe Variabilität in Proben von einem einzelnen, isolierten Baum gefunden, die darauf hinweist, dass die sexuelle Phase wichtiger ist, als bislang angenommen. Molekulare Charakterisierung von Isolaten von verschiedenen Versuchsstationen in Europa zeigte einen allgemein niedrigen Grad an genetischer Variabilität, aber eine hohe phänotypische Diversität. In Pathogenitätstests wurde ebenfalls eine hohe phänotypische Diversität, die Virulenz betreffend, festgestellt (Urbanietz und Dunemann, 2005). Auf den Proben aus Indien wurde in dieser Arbeit eine große Anzahl von sexuellen Fruchtkörpern gefunden und auch in Deutschland (wo die sexuelle Phase meist als vernachlässigbar bewertet wurde), wurden auf Feldproben Cleistothecien in geringem Umfang gefunden. Dies könnte andeuten, dass die sexuelle Reproduktion ein wichtiger Teil im Vermehrungszyklus des Pilzes ist. Während der sexuellen Vermehrung eines Pathogenes entstehen viele neue Kombinationen von Allelen, die sich dann in verschiedenen Umwelten (z. B. auch auf Pflanzen mit neuen Resistenzgenen) durchsetzen müssen (McDonald und Linde, 2002). Die Neukombination von Allelen könnte zu einer Akkumulation von verschiedenen Virulenzen gegenüber Major-Resistenzgenen führen. Dabei treten die Allelkombinationen nicht nur zufällig auf. Für Rostpilze wurde beobachtet, dass bestimmte Mutationen hin zu Virulenz in Populationen des

Getreiderostes häufiger auftreten als andere, und nicht immer unabhängig sind (Mundt, 1990).

Neue Virulenzen entstehen vermutlich durch Mutation bereits vorhandener Avirulenzgene, die dann die Gen-für-Gen-Erkennung umgehen. Dadurch bricht die Wirtsresistenz zusammen und das Pathogen kann infizieren (Agrios, 2005). Für Bakterien wurde beschrieben, dass ein Pathogen Avirulenzgene entweder völlig verlieren kann oder dass, z.B. durch Transposon-Insertion nicht-funktionale Allele des Avirulenzgenes entstehen können. Eine weitere Möglichkeit zur Veränderung von Avirulenzgenen besteht in der Mutation (De Wit, 1992). Eine genaue Mutationshäufigkeit zu bestimmen ist kaum möglich, man geht aber im Durchschnitt davon aus, dass eine Mutation in jeder Million Kopien eines Genes pro Generation auftritt. Das durchschnittliche pilzliche Genom besteht aus etwa 10.000 Genen. Somit könnte eine Zelle (oder Spore) von 100 eine Mutante sein. In einer Kolonie eines Pilzes treten somit sehr viele Mutanten auf, die in haploiden Organismen (wie dem Apfelmehltau) sofort als Phänotyp deutlich werden könnten. (Agrios, 2005). Vermutlich sind Mutationen, die die Virulenz des Pathogens betreffen, nicht häufiger als andere Mutationen, aber in Anbetracht der großen Zahl möglicher Mutanten werden sicher auch viele gebildet, die in ihrer Virulenz variieren. Diese neuen Virulenzen können dann in der sexuellen Phase des Pilzes neu kombiniert werden.

In vielen Arbeiten wird angemerkt, dass nicht benötigte Virulenzgene in Pathogenen die Fitness des Pathogens bei der Infektion eines anfälligen Wirtes reduzieren können (cost of virulence) (Bousset et al., 2002; Boyd, 2006; Lannou, 2001; Mundt, 1990; Vera Cruz et al., 2000). Avirulenzgene können Pathogenitätsfaktoren sein, die das Pathogen benötigt, um eine kompatible Verbindung mit dem Wirt zu etablieren (Hammond-Kosack und Parker, 2003). Dennoch trägt das "durchschnittliche Pathogen" gewöhnlich eine größere Anzahl an Virulenzgenen, als Resistenzgene in der assoziierten Wirtspopulation vorhanden sind. Die Häufigkeit unnötiger Virulenzgene kann dabei zwischen Regionen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten stark schwanken (Bousset et al., 2002). Für *Blumeria graminis* var. *tritici* wurde in Ungarn innerhalb von 20 Jahren ein Anstieg von durchschnittlich 2.03 auf 5.63 Virulenzgenen in den Feldpopulationen verzeichnet (Brown, 2000). Da durch die verstärkte Resistenzzüchtung mit der Zeit auch mehr Resistenzgene über längere Zeiträume und auf größeren Flächen wirksam eingesetzt werden, kann ein Anstieg in der Anzahl der vorhandenen Virulenzgene in Pathogenpopulationen durchaus erwartet werden, zumindest in den Fällen, wo diese nicht die Fitness der Pathogene beeinträchtigen. In dieser Arbeit scheinen die Anzahl infizierter *Malus*-Genotypen und die durchschnittlich befallene Blattfläche nicht negativ korreliert zu sein. Dies könnte andeuten, dass bei *P. leucotricha* das Vorhandensein mehrerer Virulenzgene die parasitische Fitness nicht beeinträchtigt. Auch für *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* in Australien ist beschrieben, dass nicht benötigte

Virulenzgene im Pathogen auftreten können, ohne Anzeichen, dass die Fitness negativ beeinflusst wird (fitness penalty) (Whisson, 1996). Die Häufigkeit der Klone mit zu den vorhandenen Resistenzen korrespondierenden Virulenzen kann sich schnell ändern. Für Gerstenmehltau wurde beobachtet, dass in zufälligen Stichproben ein Wechsel solcher Klone von 1% zu 36% innerhalb nur einer Saison auftrat (Brown, 1994). Für *PI2*-resistente *Malus*-Genotypen wurde das Auftreten von virulenten Isolaten nur sechs Jahre nach der Pflanzung beobachtet und resultierte in einem Zusammenbruch der Resistenz nach nur 10 Jahren (Caffier und Laurens, 2005). Da Apfelbäume eine sehr viel längere Nutzungsdauer haben, ist sehr viel stabilere Resistenz vonnöten, um dauerhaft den Fungizideinsatz zu reduzieren und die Züchtungsarbeit rentabel zu machen. Bei Getreide kann ein sehr viel schnellerer Wechsel der Sorten durchgeführt werden, um die Konfrontation mit sehr großen Populationen an virulenten Stämmen zu vermeiden.

Die sexuelle Vermehrung eines Pathogenes führt zu vielen neuen Kombinationen von Allelen und während der asexuellen Vermehrung werden die Kombinationen von Allelen, die zu den erfolgreichsten Genotypen gehören, durch klonale Reproduktion zusammengehalten. Diese können somit schnell eine hohe Häufigkeit erreichen und die Kombination von asexueller und sexueller Reproduktion führt sowohl zu hoher Gen- als auch Genotyp-Diversität (McDonald und Linde, 2002). Im allgemeinen weisen die Populationen am Ursprungszentrum einer Art die höchste Diversität auf. Viele *Malus*-Wildarten haben ihren Ursprung in verschiedenen Regionen Asiens. Geht man davon aus, dass auch der Apfelmehltau seinen Ursprung in diesen Regionen hat, kann dort auch eine hohe Gendiversität für den Apfelmehltau erwartet werden. Untersuchungen der Herkunft und Verbreitung des Apfelschorf-Pathogens *Venturia inaequalis* haben gezeigt, dass es seinen Ursprung in Zentralasien hat, wie der Apfel, und dass es gemeinsam mit seinem Wirt über die Seidenstrasse nach Europa kam (Gladieux et al., 2008). Da das Pathogen schon vor langer Zeit nach Europa eingeführt wurde und häufige Wiedereinführungen auftraten, sind die Schorfpopulationen in Europa heute wie ein sekundäres Ursprungszentrum zu betrachten, zwar mit weniger genetischer Variation, aber weit davon entfernt, klonal zu sein. Es wäre nicht überraschend, wenn der Apfelmehltau eine ähnliche Geschichte hätte, aber dies ist nur Spekulation, da keine Daten hierzu vorhanden sind. Die hohe Diversität der Genotypen und Variation des Apfelmehltau auf Material von Züchtungsstationen kann auch dadurch erklärt werden, dass an diesen Orten eine lange Tradition der Apfelzüchtung besteht, und somit auch eine hohe genotypische Diversität im Wirt vorhanden ist. Die Resistenzzüchtung ist schon seit längerer Zeit ein wichtiges Ziel der Züchtung und es gibt meist eine große Kollektion an resistenten Arten und Sorten an diesen Forschungsstationen. Daher war eine große Variation in der Virulenz der Isolate zu erwarten. Die große Anzahl an Genotypen im *Malus*-Sortiment wurde bewußt gewählt, denn die Verwendung eines zu

kleinen Sets könnte zu einer Unterschätzung der Rassendiversität führen (Linde und Debener, 2003). Es ist unbekannt, wie variabel das Pathogen in großen Monokulturanlagen von zumeist anfälligen Sorten ist. Die Ergebnisse von Versuchen mit Isolaten aus Erwerbsanlagen in Sachsen auf *PI1*-resistenten Genotypen deuten an, dass der resistenzbrechende Charakter weitverbreitet ist, unabhängig vom Ursprungsort des Isolates (Daten sind hier nicht gezeigt). Trotzdem scheint die *PI1*-Resistenz unter Feldbedingungen immer noch effektiv zu sein, da *PI1*-Genotypen in den Anlagen des Julius-Kühn-Institutes für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Dresden-Pillnitz immer noch resistent sind. Auch in den Versuchen von Caffier und Parisi (2007) reagierte *M. x robusta* (*PI1*) unter kontrollierten Bedingungen mit geringer Anfälligkeit auf verschiedene Isolate, aber war im Feld noch resistent. Warum im Feld Resistenzen noch wirksam sein können, obwohl bereits virulente Isolate vorhanden sind, kann verschiedene Gründe haben. Zum einen sind im Labor die Bedingungen für das Pathogen zumeist optimal, sodass eine Infektion leichter erfolgreich sein kann und auch ein stärkeres Ausmaß erreichen kann. Zum anderen muss sich das virulente Inokulum im Feld erst etablieren und vermehren, bevor Infektionen deutlich werden, denn im Labor wird meist mit verhältnismäßig großen Sporenmengen als Inokulum gearbeitet. Daher können Unterschiede in der Bewertung von Resistenz zwischen Labortest und Feld auftreten. Auf diesen Umstand wird in Kapitel 5.1.5 noch näher eingegangen.

### **5.1.2 Anfälligkeit der *Malus*-Genotypen**

Alle getesteten Isolate hatten die passenden Avirulenzgene, um von Genotypen mit den monogen bedingten Resistenzen *Pld*, *Plmis* und *Plw* erkannt zu werden, somit konnte keines der Isolate diese Genotypen infizieren. Sowohl D12 als auch MIS wiesen einmal auf einem einzelnen Blatt eine kleine Infektionsstelle auf, aber dies wurde nicht als Versagen der Resistenzeigenschaften bewertet.

Alle getesteten Isolate waren dagegen fähig, die *PI1*-Referenz A142/5 zu infizieren. Die Nachkommen von A142/5, 98/6-21 und 98/6-29 und auch *M. x robusta persicifolia* zeigten jedoch teilweise abweichende Ergebnisse (siehe Tabelle 5). Da die Nachkommen von A142/5 der übernächsten Generation höhere Resistenz zeigten als der Vorfahr, muss davon ausgegangen werden, dass sie zusätzlich andere Resistenzfaktoren von einem anderen Vorfahren gewonnen haben, möglicherweise von dem *PI2*-Elter der Kreuzung, dem *M. zumi*-Abkömmling. Auch die Resistenz von *M. x robusta persicifolia* scheint anders zu sein, als die von A142/5, der ein Abkömmling einer unbekanntes *M.x robusta*-Akzession ist. Der Unterschied hier ist allerdings, dass einige Rassen nicht infizieren können, andere dagegen im gleichen Umfang wie bei A142/5. Hier wäre zu vermuten, dass A142/5 bereits einen Teil

der ursprünglichen *PI1*-Resistenz verloren hat, der bei *M. x robusta persicifolia* noch vorhanden ist.

Im Falle von *PI2* konnten alle getesteten Isolate den *PI2*-Referenz-Genotypen *M. zumi* 274 infizieren. Somit kann angenommen werden, dass alle Isolate auf *PI2*-resistenten Pflanzen virulent sind. Die beiden weiteren *PI2*-Genotypen, 98/6-1 und 98/6-11 zeigten dagegen kaum Befall, und nur bei wenigen Isolaten, sie tragen also vermutlich zusätzlich zur *PI2*-Resistenz weitere Resistenzfaktoren.

Drei der Apfel-Genotypen mit den kombinierten Resistenzen *PI1+PI2*, 98/6-10, 98/6-2 und 98/6-5 zeigten allen getesteten Isolaten gegenüber Resistenz, mit Ausnahme des Isolates InA2-15 auf 98/6-2. 98/6-4 konnte aufgrund des durchschnittlichen Wertes für die infizierte Fläche (infected area a%) von 5% zwar als resistent eingestuft werden, zeigte aber ein abweichendes Verhalten. Die getesteten Mehltausisolate konnten diesen Genotyp zwar infizieren, aber nur in geringem Maße. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man zu dem Schluss kommen, dass nicht allein zwei Major-Resistenzgene für die *PI1*- und *PI2*-Resistenzen verantwortlich sein können.

Es wurde schon mehrfach vermutet, dass sowohl die *PI1*- als auch die *PI2*-Resistenz nicht allein auf einem dominanten Majorgen beruhen können, da die Aufspaltungsverhältnisse in vielen Nachkommenschaften einer anderen, vermutlich durch mindestens zwei Gene bedingten Resistenz entsprechen (Alston, 1976; Battle und Alston, 1996; Caffier und Parisi, 2007; Dayton, 1977; Dunemann et al., 2004; Fischer und Fischer, 1999; Gianfranceschi et al., 1999). Seglias und Gessler (1997) kritisieren, dass bei der Bonitur von Mehltaresistenz in Populationen meist zwar bis zu sieben Anfälligkeitsklassen verwendet werden, dass für die genetische Analyse die Daten aber stets in anfällig und resistent vereinfacht werden, da angenommen wird, es handle sich um qualitative oder Majorgen-Resistenz. Variation zwischen diesen Klassen wird zumeist durch Umweltfaktoren erklärt. Dadurch werden die möglichen Erkenntnisse reduziert, Information geht verloren und die Hypothese, dass mehrere quantitative Gene additive Effekte aufweisen, wird nicht getestet. Zudem beurteilen die verschiedenen Autoren die Einteilung der Klassen unterschiedlich, teilweise wird nur eine Klasse als resistent bewertet, teilweise mehrere, sodass unterschiedliche Spaltungsverhältnisse (und damit unterschiedliche genetische Hintergründe) als Erklärung der selben Situation auftreten (Bus et al., 2000; Gianfranceschi et al., 1999). Die Analyse der Mehltaresistenz erweist sich somit als sehr kompliziert. Zudem existierten zu der Zeit, als die ersten Einkreuzungen der Resistenzen durchgeführt wurden, noch keine molekularen Untersuchungsmethoden, und nicht immer steht das Ausgangsmaterial noch für Untersuchungen zur Verfügung.

Vereinfacht wird daher oft davon ausgegangen, dass für die Ausprägung der *PI1*-Resistenz mindestens ein weiteres Gen (bei Dunemann et al. (2004) Precursor-Gen *C/c* genannt) in dominanter Form vorliegen muss, und dass bei *PI2* entsprechende Verhältnisse erwartet werden können. Dunemann et al. (2004) nehmen an, dass der *C/c* Locus in Apfel häufig heterozygot auftritt, daher könne Aufspaltung erwartet werden und homozygote Genotypen treten für diesen Locus regelmäßig auf. Aufgrund von Beobachtungen an weiteren Populationen ist zu erwarten, dass A142/5 das Precursor Gen in heterozygoter Form *C c* trägt. Die drei *PI1*-Genotypen reagierten weitgehend gleich, nur traten Abstufungen in der Stärke der Infektionen auf, die durch zusätzliche Gene beeinflusst sein könnten, die vom zweiten resistenten Elter stammen könnten. *M. robusta persicifolia* aber reagierte teilweise anders, möglicherweise trägt dieser das zweite Gen noch in homozygot dominanter Form (*C C*), die anderen Genotypen haben es aber nur heterozygot vorliegen. Manche Arbeiten beschreiben, dass *PI1* eine zusätzliche Selektion auf polygene Resistenz ermögliche, denn *PI1*-Träger zeigten bei Inokulation mit Mehltau nekrotische Flecken als Zeichen einer hypersensitiven Reaktion auf den Angriff des Erregers (Alston, 1976; Evans und James, 2002). Nachkommen, die keinerlei Reaktion auf den Erreger zeigten, sollten sowohl *PI1* als auch polygene Komponenten der Resistenz tragen. Das Precursor-Gen *C/c* könnte einen wichtigen Bestandteil dieser beschriebenen polygenen Resistenz darstellen.

Geht man davon aus, dass genetisch bei *PI2* eine ähnliche Situation vorliegt, könnte die Resistenz durch die dominante Form des *PI2*-Genes (für das der Marker vorhanden ist) in Kombination mit einem zweiten Gen, *D/d* genannt, in ebenfalls dominanter Form, bedingt sein. *M. zumi* und der Genotyp 98/6-9 reagierten (bis auf die Stärke der Infektionen) gleich, die Genotypen 98/6-1 und 98/6-11 dagegen waren deutlich resistenter. Daher ist zu vermuten, dass diese, zusätzlich zu der *PI2*-Resistenz die durch die Markeranalyse bestätigt wurde, noch den zweiten Teil der *PI1*-Resistenz, *C*, der nicht mit dem Marker gekoppelt ist, in dominanter Form tragen. Die unterschiedliche Stärke der Infektionen könnte wiederum durch vorhandene Minorgene bedingt sein, die in Kombination wirken.

Die Genotypen, die die Marker für beide Majorgene tragen, reagierten bis auf den Genotyp 98/6-4 gleich, und zwar hochresistent. Die Reaktion vom Genotyp 98/6-4 war unterschiedlich von diesen, Befall trat bei allen Isolaten auf, aber nur in geringem Umfang, eher vergleichbar mit dem *PI2*-Genotypen 98/6-9. Möglicherweise ist hier das dominante *PI1*-Gen durch Rekombination verlorengegangen, der Marker für *PI1* jedoch erhalten geblieben und die Resistenz ist bedingt durch *PI2* in Kombination mit *C*.

Bei der Testung der Genotypen ohne definierte Resistenz fielen einige Genotypen als besonders wenig anfällig auf. Dazu gehörten die als resistent bekannten Wildarten *M. hupehensis* (E334-62 und 341), *M. baccata mandshurica*, *M. sieboldii* und *M. trilobata*. Da diese unter anderem in den Fruchteigenschaften meist sehr weit vom Kulturapfel entfernt

sind, ist fraglich, wie gut sich diese Resistenzen für die Züchtung nutzen lassen, da der Züchtungsprozess sehr langwierig ist. Aber auch die Sorten 'Discovery' und 'Dülmener Rosenapfel' haben sich als resistent erwiesen. Da die hier vorliegende Resistenz vermutlich polygen bedingt ist, sind sie von Interesse für die Apfelzüchtung. Auch zwei Genotypen von *M. sieversii* (4011 und 3600), der als unmittelbarer Vorfahr dem Kulturapfel von den Fruchtigenschaften her näher ist als andere Wildformen, zeigten geringe Anfälligkeit in den Testungen.

### 5.1.3 Pyramidisierung von Resistenzgenen

Die Pyramidisierung oder Kombination verschiedener Major-Resistenzgene in einem Genotyp wurde vielfach als Möglichkeit betrachtet, die Dauerhaftigkeit der monogenen Resistenzgene zu erhöhen (Brown, 1995; Burdon, 1993). Dabei besagt die Theorie, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein Pathogen gleichzeitig Virulenzen für zwei oder mehr wirksame Resistenzen entwickelt, sehr viel niedriger ist, als für einzelne Resistenzgene und dass die Resistenz daher dauerhafter ist, als bei Verwendung der einzelnen Resistenzgene (Probability theory, zitiert in Kloppers und Pretorius, (1997)).

Für den Apfel wurde die Wirksamkeit von Kombinationen von verschiedenen Major-Resistenzgenen häufig diskutiert (Battle und Alston, 1996; Kellerhals und Furrer, 1994), jedoch sind bislang keine Daten über den tatsächlichen Wert dieser Genkombinationen verfügbar. In dieser Arbeit wurden Züchtungskclone mit einzelnen Resistenzgenen und den Genen in Kombination gegen eine Kollektion von zwölf Isolaten getestet.

Die Ergebnisse zeigten dass die Resistenzgene *PI1* und *PI2*, repräsentiert durch die *Malus*-Genotypen A142/5 und *M. zumi* 274, weitgehend durch die getesteten Isolate durchbrochen sind. Daher wurde nicht erwartet, dass die Genotypen, die beide unwirksamen Gene in Kombination tragen, weiterhin effektiv vor Infektion durch diese resistenzbrechenden Isolate geschützt sind, da diese Isolate beide Avirulenzgene nicht tragen. Allerdings ist die Möglichkeit, dass sogenannte "residual effects" der überwundenen Resistenzen verbleiben, bekannt und es gibt Hinweise darauf, dass partielle Resistenz in Pflanzen häufig durch überwundene Majorgene bedingt sein könnte (Pedersen und Leath, 1988; Woo und Newcombe, 2003).

Die Mehltaresistenz des Genotypen MAL68/1, dem Original-*PI2*-Träger, wurde durch virulente Isolate sowohl unter kontrollierten Bedingungen, als auch im Feld durchbrochen (Caffier und Parisi, 2007). Trotzdem war dieser Genotyp immer noch weniger anfällig als Nachfahren der vierten Rückkreuzungsgeneration. Dies könnte durch Minorogene für teilweise Resistenz bedingt sein, die während des Selektionsprozesses verloren gegangen sind. In dieser Arbeit waren die Resistenzdonoren, A142/5 und *M. zumi* 274, anfälliger als

die Nachfahren aus der Population 98/6, die als weitgehend resistent klassifiziert werden konnten. Daher kann die Resistenz, die in der Population 98/6 auftritt, nicht durch partielle Resistenz überwundener Resistenzgene allein erklärt werden. Diese müsste eine geringere Stärke an Resistenz, verglichen mit der ursprünglichen, aufweisen. Möglicherweise treten durch die Kombination der Resistenzen Interaktionen zwischen den Genen auf, die die Wirkung der Resistenz verstärken.

Über die erfolgreiche Nutzung von Resistenzgenkombinationen gibt es wenig Berichte. Aber auch in Reis wurde die Beobachtung gemacht, dass die pyramidierten Linien eine stärkere Resistenzwirkung und ein weiteres Spektrum an Resistenz gegenüber dem Bakterienbrand aufwiesen, als nach den Reaktionen der Eltern zu erwarten war (Huang et al., 1997). So waren verschiedene pyramidierte Linien resistent gegenüber Rasse 4 von *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, obwohl beide Eltern anfällig waren. Als Erklärung wird eine mögliche Interaktion und/oder Komplementation der einzelnen Resistenzgene genannt. Auch bei Weizen/Braunrost wurde die Möglichkeit genannt, dass Interaktionen zwischen verschiedenen Resistenzgenen auftreten können, so dass die Resistenz der Kombinationen besser ist als die der einzelnen Gene (zitiert in Kloppers und Pretorius (1997)). Vergleicht man die Resistenz der 98/6-Genotypen mit der für Major-Resistenzgene typischen Immunität oder hochgradig resistenten Reaktion der Pflanzen wie bei D12, 'White Angel' und MIS beobachtet, wird deutlich, dass sich die Resistenzen in ihrer Stärke unterscheiden. Die Resistenz in der 98/6-Population scheint eher oligo- oder polygener Art zu sein, wo zwar Befall auftreten kann, jedoch nur in begrenztem Umfang. Die Mitglieder der Population zeigen dabei eine Spanne von verschiedenen Befallsintensitäten von moderat anfällig bis hochgradig resistent (Genotypen (98/6-5 und 98/6-10), die vergleichbar sind mit den anderen Genotypen mit Majorresistenzgenen.

#### **5.1.4 Vergleichende Betrachtung von Feld- und Labortests auf Resistenz**

Im Wirt-Pathogen-System Apfel/Apfelmehltau wurde vielfach zur Vorsicht gemahnt, wenn es darum ging, Ergebnisse aus Laborversuchen auf das Verhalten der Pflanzen im Feld zu übertragen. Auch Caffier und Parisi (2007) stellten leichte Diskrepanzen im Grad der Resistenz unter kontrollierten Bedingungen und in Freilandversuchen für *M. robusta* 5 fest. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit Beobachtungen über mehrere Jahre an verschiedenen Orten in Europa verglichen die von Urbanietz (2002) publiziert worden sind. Dabei war als Hauptunterschied festzustellen, dass manche Sorten, die im Freiland als feldresistent bewertet wurden, im Laborversuch mit isolierten Blättern eine anfällige Reaktion zeigten. Allerdings traten auch zwischen den einzelnen Orten Unterschiede im Verhalten der Genotypen auf. So zeigen z.B. die Laborergebnisse für *M. zumi calocarpa* (unter

kontrollierten Bedingungen anfällig) Übereinstimmung zu einem Ort in Europa, aber waren abweichend vom Verhalten an anderen Orten (Urbanietz, 2002). Unterschiede wurden auch für 'Rote Sternrenette' und *M. x robusta persicifolia* gefunden, der in der Arbeit von Urbanietz als *PI1*-Referenz diente. Beide wurden im Feld als resistent klassifiziert, waren aber in dieser Arbeit unter Labor-Testbedingungen anfällig. Auch in der Arbeit von Caffier und Parisi, (2007) wies *M. x robusta* abweichende Ergebnisse zwischen kontrollierten Bedingungen und Freiland auf, andere dort geteste Genotypen waren generell in Übereinstimmung mit den hier gefundenen Ergebnissen. Im Ganzen lässt sich sagen, dass im Laborversuch die meisten Genotypen zwar anfälliger reagieren als im Freiland, jedoch durchaus vergleichbar. Somit werden die hier erlangten Ergebnisse als durchaus nutzbar für die Einschätzung des Verhaltens im Feld angesehen. Die stärkere Anfälligkeit ist vermutlich auch durch die für das Pathogen optimalen Bedingungen und möglicherweise durch eine verlangsamte Abhärtung der Blätter (Ausbildung der Altersresistenz) unter Gewächshausbedingungen verursacht. Zudem wird im Laborversuch darauf geachtet, dass das Pathogen auch wirklich zum Zeitpunkt der höchsten Anfälligkeit auf die Blätter trifft, was in der Natur doch mehr dem Zufall überlassen ist.

Die 98/6-Population wird am JKI Dresden seit einigen Jahren im Feld ohne Fungizideinsatz beobachtet und dort fällt auf, dass die Genotypen, die keinen der *PI*-Marker tragen, häufigen und starken Befall zeigen. Die Genotypen mit Markern sind bis auf zwei Ausnahmen (jeweils in einem Jahr deutlicher Mehltaubefall) gesund gewesen. Bei diesen Ausnahmen handelt es sich zum einen um die 98/6-9 (*PI2*), der andere ist ein *PI1*-Genotyp (hier nicht verwendet). Eine mögliche Erklärung wäre, dass in diesen Jahren virulente Isolate zu einem für sie günstigen Zeitpunkt auftraten und sich deshalb lokal vermehren konnten. Jedoch kam es offensichtlich zu keiner weiteren Ausbreitung, da Bäume im Umfeld und im Folgejahr bislang nicht betroffen waren.

### **5.1.5 Konsequenzen für die Züchtung**

Die Pathogenität von Isolaten, die in dieser Arbeit unter Laborbedingungen als virulent beurteilt wurden, wurde nicht an ganzen Bäumen getestet, und somit ist der mögliche Schaden, den diese Isolate im Freiland ausrichten könnten, unbekannt. Trotzdem geben die vorliegenden Ergebnisse wichtige Informationen über die Virulenz von Apfelmehltau-Isolaten. Der Zusammenbruch der Mehltairesistenz in Frankreich hat gezeigt, dass ein großes Risiko besteht, dass virulente Isolate sich schnell in Anlagen etablieren können. Die Wahrscheinlichkeit, dass dies auch für *PI1*-Genotypen auftritt, ist vermutlich höher als für die anderen Major-Resistenzen. Daher wäre eine weitere Nutzung von *PI1* und *PI2* alleine nicht empfehlenswert, jedoch scheinen die Gene in Kombination eine deutlich wirksamere

Resistenz zu geben. Die Kombination einer Majorgenresistenz mit polygener Resistenz scheint immer noch die vielversprechendste Strategie zu sein, um einen Zusammenbruch einer Resistenz zu verhindern. Der polygene Anteil der Resistenz trägt ein niedrigeres Risiko, überwunden zu werden und reduziert somit eine mögliche Infektion vermutlich auf ein akzeptierbares Level, selbst wenn die Majorgenresistenz durchbrochen ist.

In der Vergangenheit war es in der Apfelmehltauzüchtung schwierig, Pflanzen im Feld verlässlich auf Resistenz hin zu bewerten. Häufig sind bis zu 10% der als resistent selektierten Pflanzen in Wahrheit anfällig, vermutlich verdeckt durch eine heterogene Verteilung des natürlichen Inokulums (Caffier und Laurens, 2005). Heutzutage können die Entwicklung eng an Majorgene gekoppelter molekularer Marker und die Detektion von Quantitative Trait Loci (QTL) sehr nützliche Werkzeuge sein, um die Selektion von Genotypen mit dauerhafter Resistenz zu verbessern. Dabei ist aber zu beachten, dass das Wissen um das Vorhandensein von Resistenz allein nicht ausreichend ist, um die Pflanzenreaktion vorherzusagen. Die Virulenzen von Mehltaupopulationen an verschiedenen Standorten können beträchtliche Unterschiede zeigen (Lespinasse, 1989). Ein Differentialsortiment an Apfelmehltau-Isolaten verschiedener Rassen wäre wünschenswert, um vielversprechende Apfelmehltau-Genotypen zu testen, aber im Gegensatz zum Apfelschorf und anderen Wirt-Pathogen-Systemen (z.B. *Sphaeroteca fuliginea* auf Cucurbitaceae, Cohen et al. (2004)) ist es (noch) nicht möglich, Isolate in Rassen einzuteilen. Die Virulenzkomposition der hier getesteten Isolate scheint sehr komplex zu sein. Darüber hinaus ist die Erhaltung reiner Mehltauisolate sehr zeit- und arbeitsaufwändig. Um dauerhafte Resistenz an verschiedenen Standorten zu testen, ist es immer noch ratsam, die Pflanzen in verschiedenen Umwelten, d.h. an verschiedenen Standorten, zu testen.

Polygene oder partielle Resistenz ist häufig dauerhafter als die meist monogen bedingte Majorgenresistenz. Bei langlebigen Pflanzen ist die Dauerhaftigkeit ein wesentlicher Faktor (Woo und Newcombe, 2003), daher erscheint es vielversprechend, diese in Apfelsorten zu integrieren. Beim Apfel ist ein niedrigeres Niveau an Resistenz gegenüber Mehltau akzeptabel, um den Einsatz von Fungiziden zu reduzieren, daher kann schon eine relativ geringe Anfälligkeit, bedingt durch polygene Resistenz, ausreichend sein (Lespinasse, 1989). In der *Malus*-Testkollektion, die hier verwendet wurde, waren einige Quellen effektiver polygener Resistenz vorhanden und sind diese in ihre Nützlichkeit für Apfelmehltauzüchter bestätigt worden.

Die Genotypen mit den pyramidierten *PI1*- und *PI2*-Genen haben überwiegend sehr starke Resistenz gezeigt. Dies ist vielversprechend, da die Widerstandsfähigkeit hoch war, obwohl die einzelnen Resistenzen in den Experimenten klar von virulenten Isolaten durchbrochen wurden. Daher scheint es, als könne die Kombination der Resistenzgene zu einer dauerhafteren Resistenz in den Nachfahren führen, die nicht einem zu hohen Risiko

ausgesetzt ist, durchbrochen zu werden. Es wäre ein großer Verlust für die Züchtung, wenn *PI1* und *PI2* für die Zukunft völlig unbrauchbar wären, denn sehr viel Züchtungsarbeit baut auf diesen Resistenzgenen auf. Eine detailliertere Analyse dieser Resistenzkombination mittels QTL-Analyse wäre möglicherweise hilfreich, um die Mechanismen zu verstehen, die zu einer höheren Resistenz in den Nachfahren als den Vorfahren führt.

## **5.2 Molekulare Charakterisierung von *Podosphaera leucotricha***

Die molekulare Charakterisierung von Isolaten des Apfelmehltaus war eines der Hauptziele dieser Arbeit. Dabei hat sich herausgestellt, dass molekulare Arbeiten mit diesem Pathogen eine große Herausforderung sind, da zum einen die Gewinnung von ausreichend Material zur Untersuchung problematisch ist, zum anderen die Markerentwicklung selbst deutlich schwieriger war, als erwartet. Dennoch konnten Marker entwickelt werden, die eine grobe Charakterisierung von Isolaten und Feldproben ermöglichen.

### **5.2.1 Entwicklung von SSR-Markern**

Bei der Entwicklung von SSR-Markern für den Apfelmehltau traten zahlreiche Probleme auf. Hochgerechnet enthielten etwa 20% der gesamten Klone der partiellen genomischen Bank ein Mikrosatellitenmotiv, dies entspricht auch den Angaben für andere pilzliche Genome (Dutech et al., 2007). Unklar ist, warum mit etwa 40% der aufgefundenen SSR-Motive viele SSRs angereichert wurden, die nicht in den Anreicherungsritten verwendet wurden. Über die tatsächliche Häufigkeit von Mikrosatellitensequenzen im Genom von *Podosphaera leucotricha* (oder anderen Pilzen) sind keine genauen Angaben verfügbar. Generell scheinen in den Genomen von Pilzen sehr viel weniger Mikrosatelliten aufzutreten, als bei anderen Organismen (Dutech et al., 2007; Karaoglu et al., 2004), wobei nicht allein die Größe des Genomes entscheidend ist. Im Verhältnis sind die Mikrosatellitenmotive bei Pilzen zur geringeren Größe des Genomes noch unterrepräsentiert (Dutech et al., 2007).

Aus Kosten- und Aufwandsgründen wurde ein PCR-Präselektionsschritt eingeschoben, mit dem Klone, die ein SSR-Motiv enthielten, von negativen Klonen in der partiellen genomischen Bank unterschieden werden sollten, um unnötige Sequenzierungen zu vermeiden. Etwa 80% der als positiv selektierten Klone (d.h. mit SSR) enthielten tatsächlich ein SSR-Motiv, aber auch 33% der als negativ selektierten. Für klarere Aussagen müssten größere Anzahlen an Klonen untersucht werden. Allerdings führten Geräteprobleme auch zu Schwierigkeiten bei der Auswertung der Ergebnisse der Präselektions-PCR, so dass es nicht möglich ist, eine klare Aussage über den Nutzen der Präselektion zu treffen. In mündlicher

Mitteilung (N. Harvey, East Malling Research, Großbritannien) wurde die Methode als sehr zuverlässig beschrieben.

Die Mehrzahl der positiven Fragmente war nicht geeignet, um Primer abzuleiten. Dies hatte verschiedenste Gründe. Teilweise war das Mikrosatellitenmotiv zu kurz. Für Pilze ist beschrieben, dass die Mehrzahl der vorhandenen Mikrosatellitenmotive kurz ist und dass die relative Häufigkeit der SSRs mit ansteigender Wiederholungszahl deutlich abnimmt (Karaoglu et al., 2004). Lange Motive sind sehr selten, bei der Analyse von 14 pilzlichen Genomen zeigte sich, dass etwa 90% der SSRs nur geringe Wiederholungen (<8) aufweisen (Dutech et al., 2007). Es wird davon ausgegangen, dass kurze Loci ein geringeren Grad an Polymorphismen bieten, da die Mutationsrate von Mikrosatelliten generell mit steigender Anzahl der Wiederholung ansteigt. Daher wurden keine SSR-Motive ausgewählt, die weniger als fünf Wiederholungen hatten. Die Motive in den Fragmenten, für die erfolgreich Primer entwickelt werden konnten, waren relativ kurz (längste Wiederholung war (AG)<sub>16</sub>, (CT)<sub>14</sub>) vermutlich konnten deshalb mit den Primern keine Polymorphismen detektiert werden. Häufig wurden zwar lange Mikrostellitensequenzen in den Fragmenten aufgefunden, diese lagen jedoch zumeist direkt am Ende des Fragmentes und daher konnte kein flankierender Primer abgeleitet werden, oder die Sequenz war aufgrund ihrer Basenzusammensetzung nicht für Primerableitung geeignet. Dieses scheint ein generelles Problem bei der Entwicklung (nicht nur) von pilzlichen SSR-Markern zu sein (Dutech et al., 2007; Shan et al., 1999; Squirrell et al., 2003). Für manche Arten konnte während der Markerentwicklung bei über 45% der Loci, für die Primer abgeleitet wurden, kein Produkt amplifiziert werden (Dutech et al., 2007; Zane et al., 2002). In dieser Arbeit war die Ausbeute funktionierender Primer noch geringer, nur fünf von 13 (38%) entwickelten Primerpaaren amplifizierten Produkte der erwarteten Größe.

Beim Sequenzieren traten gehäuft Probleme auf. Teilweise brach die Sequenzierung ab, häufig wurden nicht an allen Fragmentenden die Adaptersequenzen gefunden und generell schien die Sequenzierung problematisch zu sein, so dass viele Wiederholungen durchgeführt werden mußten. Von ähnlichen Problemen berichten auch Dutech et al. (2007), die 17 verschiedene genomische Banken für verschiedene pilzliche Organismen angelegt haben. Die Sequenzierungsprobleme traten bei den meisten Banken auf und in verschiedenen Laboren. Möglicherweise ist die Problematik bedingt durch die Wahl des Adapters (*MluI*, auch hier verwendet), oder dadurch, dass die Adaptersequenzen revers komplementär sind.

Dutech et al. (2007) kommen nach Analyse von 17 eigenen genomischen Banken, 50 Studien zu verschiedenen phylogenetischen Gruppen und nach Auswertung von 37 pilzlichen Arbeiten in der Literatur zu dem Schluss, dass die Entwicklung von Mikrosatellitenmarkern für Pilze eine besondere Herausforderung ist, und in Zeit- und

Geldaufwand nicht zu vergleichen mit anderen Organismen. Kurz zusammengefasst liegt dies vermutlich an der geringeren Größe der Genome, der geringeren Häufigkeit der Motive, ihrer Kürze und der Tatsache, dass die meisten Motive nicht nutzbar sind. Da Mikrosatellitenmarker in der Regel für jede Spezies neu entwickelt werden müssen, ist fraglich, ob der große Aufwand der Erstellung einer genomischen Bank und der Markerentwicklung sinnvoll ist. Je nach Fragestellung bieten sich andere Marker wie AFLPs, RAPDS, ISSRs oder auch spezifische SNP-Marker an, die zwar nur zwei Allele pro Locus ermöglichen, aber leichter in großen Anzahlen zu entwickeln sind. Der Vorteil, den SSRs zum Beispiel AFLPs gegenüber haben, dass nur sehr geringe Mengen an DNA zur Untersuchung benötigt werden, kann durch Umwandlung polymorpher AFLP-Fragmente in spezifische SCAR-Marker ausgeglichen werden. Man muss davon ausgehen, dass, obwohl in manchen Arbeiten auch von Problemen bei der Entwicklung von SSR-Markern für Pilze berichtet wird, ein Großteil der durchgeführten Arbeiten wegen Misserfolges gar nicht erst zur Publikation gelangte.

Squirrell et al. (2003) berichten, dass bei Pflanzen die Sequenzierung von etwa 60 Klonen benötigt wird, um 38 SSRs zu identifizieren, dazu Design von 20 Primerpaaren, um 10 funktionierende Marker zu erhalten. Hier wurden 159 Klone sequenziert, 135 enthielten SSRs, 13 Primerpaare wurden entwickelt und führten zu 5 funktionierenden, jedoch nicht polymorphen Markern. Zu dieser Problematik kommt hinzu, dass die veröffentlichten Marker häufig nur an geringen Individuenzahlen getestet wurden. Bei größeren Untersuchungen treten häufig zusätzlich unerwartete Probleme auf, durch atypische Bewertung von genetischen Mustern, Auftreten von Nullallelen und komplexe Bindungsmuster.

### **5.2.2 Molekulare Charakterisierung mittels AFLP-, RAPD- und SCAR-Markern**

Da die Entwicklung von Mikrosatellitenmarkern für den Apfelmehltau nicht zum gewünschten Ziel, der molekularen Charakterisierung von Isolaten und Feldproben des Pilzes mittels SSR-Markern führte, wurde nach Alternativen gesucht. Die AFLP-Technik bietet sich zur Analyse von wenigen Proben an und liefert in der Regel eine relativ große Zahl an verlässlichen Markern. Zur Testung großer Anzahlen an Proben, zudem Feldproben, wo nur minimale Mengen an DNA (in möglicherweise schlechter Qualität) des zu untersuchenden Organismus zur Verfügung stehen, ist diese Technik jedoch nicht geeignet. Da auch Testungen verschiedenster RAPD-Primer nicht zu einer ausreichenden Anzahl an einsetzbaren Markern führten, wurden polymorphe AFLP-Banden in spezifische SCAR-Marker umgewandelt. Aufgrund von zeitlichen Begrenzungen stand somit nur eine sehr geringe Anzahl an geeigneten Markern zur Verfügung, um die Feldproben zu analysieren. Die drei verschiedenen Dendrogramme weisen aber dennoch darauf hin, dass selbst mit der

geringen Anzahl von nur fünf Markern die grobe Struktur der genetischen Variabilität festgestellt werden konnte. In allen drei Dendrogrammen wurden die Isolate des Apfelmehltaus in zwei zum größten Teil übereinstimmende Hauptgruppen unterteilt. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Urbanietz und Dunemann (2005), die 31 Isolate mit Hilfe von 54 Polymorphismen in zwei Cluster einteilen konnten. Urbanietz und Dunemann berichten auch über die Schwierigkeit, geeignete Marker für den Apfelmehltau zu entwickeln, da in deren Versuchen nur 4,5% der AFLP-Banden polymorph waren und somit eine Vielzahl von Primerkombinationen getestet werden musste. In dieser Arbeit wurde deshalb die Anzahl der selektiven Basen verringert, was zu einer weitaus höheren Anzahl an auswertbaren Banden pro Primerkombination führte (etwa 60-100 statt 25-30). Zudem trägt wohl auch die verwendete Kollektion an Isolaten dazu bei, dass in dieser Arbeit ein höherer Prozentsatz polymorpher Banden (ca. 10%) aufgefunden wurde. Urbanietz und Dunemann untersuchten lediglich europäische Isolate, mit dem Schwerpunkt Ahrensburg, wohingegen in dieser Arbeit zusätzlich Isolate aus China und Indien verwendet wurden. Für andere Pathogene wurden unterschiedliche Polymorphiegrade bei Untersuchungen mit molekularen Markern dokumentiert, z.B. 20% für *Phytophthora infestans* (AFLP), 36% für *Phialophora gregata* (braune Stengelfäule an Soja, AFLP), 47% für *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (RAPD) und 50% für den Rebenmehltau *Erysiphe necator* (RAPD) (zitiert in Urbanietz, 2002).

Ein geringer Polymorphiegrad auf genetischer Ebene wird als Anzeichen dafür angesehen, dass die sexuelle Phase des Pathogenes relativ unbedeutend ist. Beim Apfelmehltau besteht keine Klarheit darüber, ob die sexuelle Phase für die Populationsdynamik wichtig ist. Viele Autoren gehen davon aus, dass sich der Pilz weitestgehend asexuell vermehrt (Berwith, 1936; Smith et al., 1988; Stalder, 1954). Jedoch gibt es molekulare Hinweise darauf, dass die sexuelle Phase bislang unterschätzt wurde (Gessler et al., 2000; Urbanietz und Dunemann, 2005). So war zwar beim Apfelmehltau ein sehr geringer Grad an Polymorphismen in den Markeranalysen zu finden, jedoch wiesen die untersuchten Isolate dennoch eine sehr hohe Diversität auf. Entsprechend sind auch die Ergebnisse dieser Arbeit, denn keine zwei Isolate weisen exakt die gleichen Marker auf und wären somit als Klone zu bezeichnen, alle 27 mit AFLP-Markern untersuchten Isolate waren unterschiedliche Haplotypen. Auch Isolate, die aus der selben Knospe isoliert wurden, zeigten Unterschiede, sowohl bei den Markeranalysen, als auch bei der Virulenztestung. Bei Organismen, die sich (fast) ausschließlich asexuell über Klone vermehren, würde man dagegen wenig genetische Variabilität erwarten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen in verschiedenen Punkten Ähnlichkeit zu Verhältnissen beim näher untersuchten Rebenmehltau *Erysiphe necator* auf. Diese Ergebnisse könnten für die eigenen Betrachtungen des Apfelmehltau wichtig sein. Eine hohe Diversität an

Haplotypen wurde auch dort berichtet (Cortesi et al., 2004; Stummer et al., 2000). Es hat sich gezeigt, dass zwei genetisch sehr unterschiedliche Gruppen von Isolaten existieren, die sich phänotypisch jedoch sehr ähnlich sind (Bouscaut und Corio-Costet, 2007; Miazzi et al., 2008; Montarry et al., 2009; Montarry et al., 2008; Péros et al., 2005). Eine wachsende Anzahl von genetischen Studien an Pflanzenpathogenen zeigt, dass versteckte genetische Diversität in Form von kryptischen Spezies bestehen kann. Mit Hilfe von molekularen Markern ließen sich Isolate bei verschiedenen Pflanzenpathogenen in zwei klar getrennte Gruppen einteilen, z.B. bei *Colletotrichum gloeosporioides* an *Stylosanthes* (He et al. 1996), *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* an Weizen (Lebreton et al., 2004), Mehltau an *Syringa* (Seko et al., 2008), *Leptosphaeria maculans* an Raps (Williams und Fitt, 1999) und *Botrytis cinerea* (Fournier et al., 2005). Bei vielen der Beispiele lassen sich die Mitglieder der beiden Gruppen meist nur schwer phänotypisch unterscheiden, jedoch gibt es Unterschiede z.B. in der Aggressivität, in der Ausprägung von speziellen Symptomen oder auch dem Auftreten der sexuellen Phase. So könnten auch die beiden durch molekulare Marker bestimmbaren Gruppen beim Apfelmehltau noch unbekannte, deutlich unterschiedliche Eigenschaften aufweisen.

Es wurden zahlreiche Vermutungen angestellt, wodurch der große genetische Unterschied bei *E. necator* begründet ist, in neueren Arbeiten hat sich herausgestellt, dass sich die zwei Gruppen sowohl in ihrer Vermehrung (asexuell und sexuell), als auch in der ökologischen Nische, die sie besetzen, unterscheiden (Montarry et al., 2009). Gruppe A-Isolate überwintern in den Knospen, treten hauptsächlich zu Beginn der Vegetationsperiode bis zum Juni auf und führen beim Austrieb zu sogenannten "flagshoots", stark befallenen jungen Trieben (Miazzi et al., 2008; Montarry et al., 2009; Montarry et al., 2008). Gruppe A-Isolate vermehren sich vermutlich ausschließlich asexuell über Bildung großer Mengen an Konidien. Sobald die Knospen für die nächste Vegetationsperiode gebildet werden, werden sie vom Mycel wiederbesiedelt und damit "verschwinden" die Gruppe A-Isolate für die laufende Vegetationsperiode wieder. Gruppe B-Isolate sind teilweise auch schon zu Beginn der Epidemie auffindbar, treten aber verstärkt von Juli bis Oktober auf und bilden in erster Linie den Sekundärbefall auf Fruchtrauben und Trieben (Miazzi et al., 2008; Montarry et al., 2009). Gruppe B-Isolate können durch asexuelle Vermehrung entstanden sein und in den Knospenschuppen überwintern wie Gruppe A-Isolate, in erster Linie sind sie aber Produkte sexueller Vermehrung und überdauern als Ascosporen in Cleistothecien an der Rinde der Rebstöcke (Montarry et al., 2008). Auch beim Apfelmehltau sind beim Austrieb befallener Triebe den "flagshoots" entsprechende Symptome zu beobachten, die durch den Primärbefall, der als Mycel in den Knospen überwintert, verursacht werden. Im Verlauf der Epidemie werden dann neugebildete junge Blätter (oder auch Früchte) durch den

Sekundärbefall geschädigt. Ob sich Isolate des Primär- und Sekundärbefalls beim Apfelmehltau hinsichtlich ihrer Vermehrung unterscheiden, ist jedoch unbekannt.

Über die Fähigkeit der erwähnten A-Isolate des Rebenmehltau, sich sexuell zu vermehren, sind unterschiedliche Berichte zu finden. In den meisten Fällen konnte nur ein "mating type" oder Kreuzungstyp in dieser Gruppe aufgefunden werden (Montarry et al., 2008), jedoch haben Cortesi et al. (2005) und Montarry et al. (2009) auch beide Formen im Verhältnis 1:1 nachweisen können (in diesem Merkmal gibt es offensichtlich geographische Unterschiede). Auch über die Möglichkeit, dass Hybriden der beiden Gruppen entstehen, gibt es unterschiedliche Berichte. So konnten (Bouscaut und Corio-Costet, 2007) nachweisen, dass 18% der Isolate, die laut dem Marker Cyp51 in Gruppe B eingeteilt wurden, auch den viel sensitiveren Retrotransposon-Marker für die A-Gruppe aufwiesen. Auch Montarry et al. (2009) fanden Unstimmigkeiten in Markerdaten, die durch Hybridisierung in geringem Umfang zu erklären wären. Zudem konnten in gezielten Kreuzungen zwischen Isolaten der beiden Gruppen teilweise auch Cleistothecien mit lebensfähigen Ascosporen erzeugt werden. Ob unter natürlichen Bedingungen eine Hybridisierung stattfindet, ist jedoch nicht geklärt. Beide Gruppen erhalten die differenzierte genetische Struktur dadurch, dass sie sich zeitlich im Auftreten unterscheiden und somit eine Rekombination zumindest weitgehend ausschließen (Montarry et al., 2009). Aufgrund der vorrangig asexuellen Vermehrung ist die genetische Diversität der Gruppe A-Isolate weitaus geringer als innerhalb von Gruppe B (Cortesi et al., 2005). Insgesamt ist der genetische Unterschied innerhalb der beiden Gruppen kleiner als zwischen den beiden Gruppen. Auch beim Apfelmehltau unterscheiden sich die beiden Gruppen deutlich hinsichtlich ihrer genetischen Diversität, Gruppe 1 hat sich als weitaus homogener herausgestellt als Gruppe 2 und eine hohe genetische Homogenität weist auf vorwiegend asexuelle Vermehrung hin.

Eine mögliche Erklärung, wodurch diese zwei isolierten Gruppen beim Rebenmehltau entstanden sein könnten, ist eine unabhängige Einführung der verschiedenen "mating types" oder Kreuzungstypen des Pathogenes von den USA nach Europa (Delye et al., 1997). Nach Einführung des Rebenmehltaus in Europa wurde über 40 Jahre lang von keinem Auftreten von Cleistothecien berichtet, somit fand nur asexuelle Vermehrung statt. Während der 1940er Jahre traten plötzlich an vielen Orten große Mengen an Cleistothecien auf und heute sind sie überall in Europa anzutreffen. Auch beim Mehltau an *Syringa* wurde nachgewiesen, dass sich die zwei vorkommenden Gruppen von Isolaten (K-Typ und S-Typ) im Auftreten der sexuellen Phase deutlich unterscheiden. Der K-Typ, der seinen Ursprung vermutlich in Ostasien hat, bildet viele Chasmothecien (sexuelle Fruchtkörper), der S-Typ, der ursprünglich aus Europa stammte, dagegen nicht oder nur sehr wenig. In den 1990er Jahren wurde der K-Typ auch in Europa eingeführt und seitdem werden auch in Zentraleuropa vermehrt Chasmothecien aufgefunden (Seko et al., 2008). Auch *B. cinerea* weist

Unterschiede auf, Gruppe I wies deutlich geringere genetische Diversität auf und nur in Gruppe II konnten Hinweise auf regelmäßige Rekombination nachgewiesen werden (Fournier et al., 2005). Eine deutliche Unterteilung von verschiedenen Gruppen innerhalb einer Pathogenart, wie hier auch beim Apfelmehltau beobachtet, scheint also nicht ungewöhnlich zu sein.

Genauer betrachtet scheint sich die Situation beim Apfelmehltau dennoch von den beschriebenen zu unterscheiden. Wie der Apfelmehltau nach Europa gelangte, ist unklar. In dieser Arbeit wurden auch Proben aus Asien untersucht, wo viele Wildapfelarten heimisch sind und somit Genzentren des Apfel und möglicherweise auch seiner Pathogene liegen könnten. Die europäischen und asiatischen Isolate unterschieden sich molekular nicht deutlich. Eine stufenweise Einführung nach Europa wie dies beim Rebenmehltau angenommen wird, erscheint beim Apfelmehltau nicht wahrscheinlich, denn in der Literatur wurde zwar die Bedeutung der sexuellen Phase in Frage gestellt, jedoch wurde das Auftreten sexueller Fruchtkörper generell beschrieben (Berwith, 1936; Smith et al., 1988; Stalder, 1954).

Wodurch die Differenzierung der Mehltausolate erfolgt, ist unklar. Verschiedenste Informationen, die für den Rebenmehltau vorhanden sind, sind beim Apfelmehltau unbekannt. Bekannt ist, dass *Podosphaera leucotricha* heterothallich ist, jedoch gibt es keine molekularen Marker für die unterschiedlichen "mating types". Da auch andere Mehltauprimere erfolgreich für den Apfelmehltau angepasst werden konnten (für das mitochondriale Cytochrom *b*-Gen), wäre es eventuell möglich, auf diesem Wege geeignete Marker zu entwickeln. Primär- und Sekundärbefall scheinen beim Apfelmehltau für die Einteilung der Gruppen nicht relevant, in beiden Gruppen befanden sich Isolate beider Typen. Für weitergehende Untersuchungen des Apfelmehltau sollten zukünftig mehr spezifische Primer entwickelt werden, da diese am verlässlichsten zu Ergebnissen führen (bei den RAPD-Primern traten mehr Unklarheiten oder Ausfälle auf und sie sind weniger reproduzierbar). Für eine grobe Einteilung von Isolaten reichen wenige Marker, nur für genauere Informationen werden z.B. AFLPs benötigt. Verschiedene Standorte könnten untersucht werden, um herauszufinden, ob unterschiedliche Typen vorherrschend sind. Beim Rebenmehltau hat sich herausgestellt, dass sich Gruppe A- und B-Isolate hinsichtlich ihrer Aggressivität unterscheiden (Montarry et al., 2008). Gruppe A-Isolate haben eine geringere Keimrate und somit Infektionseffizienz, zeigen aber mehr Aggressivität hinsichtlich ihrer Latenzperiode, in der Läsionsgröße und der Anzahl der Sporen pro Läsion. Gruppe B-Isolate produzieren kleinere Anzahlen an Konidien, jedoch mit höherer Infektionseffizienz. Der Schaden, den eine Epidemie anrichtet, war in der Regel höher, wenn die Epidemie schon mit Gruppe-B-Isolaten initiiert wurde, auch im Verlauf der Epidemie nahm die Aggressivität des Pathogenes zu, entsprechend der Zunahme an Gruppe-B-Isolaten in der Population

(Montarry, 2009). Auch bei *G. graminis* var. *tritici* unterschieden sich die Isolate der beiden Gruppen hinsichtlich ihrer Aggressivität (G2 38%, G1 29,5% (Lebreton et al., 2004)). Für die hier untersuchten Isolate lässt sich nur schwer eine Aussage treffen, da nicht alle Isolate, deren Virulenz getestet wurde, in den Markeranalysen einbezogen waren. Es deutet sich aber an, dass die Einteilung in Markergruppen hier nicht mit der Aggressivität der Isolate korreliert ist. Fraglich ist, ob eine unterschiedliche Aggressivität oder Lebensweise der Isolatgruppen auf die Bekämpfung des Pathogenes einen Einfluss hat.

### 5.3 Cytochrom *b*-basierte Fungizidresistenz

Ursprünglich wurden die Cytochrom *b*-Sequenzen des Apfelmehltau in dieser Arbeit bearbeitet, um weitere Marker für die molekulare Unterscheidung der Isolate zu entwickeln. Dabei hat sich herausgestellt, dass eine Nutzung als Marker nicht geeignet war. Jedoch zeigten die Sequenzanalysen an *P. leucotricha* deutlich eine hohe Variabilität seiner Cytochrom *b*-Gensequenz. Dies steht in klarem Kontrast zur geringen Variabilität, die für viele andere Pilze gefunden wurde. Sequenzanalysen zum Beispiel von verschiedenen Isolaten des Getreidemehltaus *B. graminis* zeigten, abgesehen von der G143 Mutation, keinen Sequenzunterschied in den Cytochrom *b*-Sequenzen (Robinson et al., 2002). Nur in Isolaten des Gurkenmehltaus *P. fusca*, wurden neben der G143A auch weitere Aminosäureaustausche dokumentiert (Ishii et al., 2001). In allen beschriebenen Fällen führte die G143A Mutation zu einer vollständigen Resistenz gegenüber Strobilurinfungiziden.

Ein unvollständiger Verlust der Wirkung von Strobilurin-Fungiziden wurde für die F129L-Mutation des selben mitochondrialen Genes beschrieben. Die durch diese Mutation bedingte Resistenz ist in ihrer Ausprägung sehr viel niedriger als die durch die G143A bedingte. In F129L-Mutanten von *Alternaria solani* und *Septoria tritici* wurde eine Veränderung (shift) in der Sensitivität im Feld beobachtet, aber Kreuzresistenz gegenüber anderen Wirkstoffen der QoI Fungizide war weniger auffällig (Pasche et al., (2005); siehe auch: <http://www.epilogic.de>). In dieser Arbeit wurde kein Isolat gefunden, welches den F129L Austausch aufwies.

Es ist bekannt, dass Mitochondriengenome um bis zu 10% höheren Mutationsraten unterliegen als das Kerngenom. Eine Erklärung für die Akkumulation von mitochondrialen Defekten ist, dass die mitochondriale DNA den reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen intermediates; ROIs) der oxidativen Respiration ausgesetzt ist. Dabei führt das Fehlen der schützenden Histone in den Mitochondrien zu den hohen Mutationsraten. Zudem fehlen manche der Reparaturmechanismen, die im Kern dazu dienen, die Mutationsrate der DNA zu reduzieren (Avila-Adame und Köller, 2003; Taylor et al., 2002). In verschiedenen pathogenen Bakterien wurde Antibiotikumresistenz durch Punktmutationen bewirkt und kann

adaptiv induziert werden. Antibiotika mit letaler Wirkung (die adaptive Mutationsmechanismen verhindern sollten) zeigen bei geringen Konzentrationen eher bakteriostatische Wirkung, so dass Stress-induzierte Mutationen einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung von Antibiotika-Resistenz haben könnten (Martinez und Baquero, 2000). In Gegenwart von Strobilurin-Fungiziden könnte die Mutationsrate in der mitochondrialen QoI-Angriffsstelle spezifisch erhöht sein, bedingt dadurch, dass als Konsequenz des behinderten Elektronenflusses vermehrt ROIs freigesetzt werden. Es könnte daher angenommen werden, dass der Anstieg in der Mutationsrate des Cytochrom *b*-Genes ein Beispiel für adaptive Mutation darstellt (Rosenberg, 2001).

Bislang ist unbekannt, wie die Häufigkeit einer Mutation von einem einzelnen Individuum in mehreren hundert oder tausend Kopien zu einem Status ansteigen kann, in dem die sich als Phänotyp ausprägt. Die Vererbung der Zellorganellen und ihrer Genome ist komplex und folgt nicht den Mendelschen Gesetzen (Xu, 2005). Verschiedene Mechanismen können die Variabilität der Organellen beeinflussen. Zu diesen Mechanismen zählen: Anastomosen, Rekombination zwischen verschiedenen mtDNA-Molekülen durch Fusion und anschließende Teilung, das Auftreten suppressiver Mutation, welche zu einem Verschwinden der Wildtyporganellen innerhalb der Zellen führen kann, zufällige Verteilung und auch cytoplasmatische Segregation, welche die Zelle befähigt, die vorhandenen Organellengenome verschieden auf Tochterzellen zu verteilen (Barr et al., 2005; Hausner, 2003).

Im Cytochrom *b*-Gen von Pilzen und Hefe wurden bislang elf verschiedene Punktmutationen in zwei verschiedenen Bereichen beschrieben, die zu einer QoI-Resistenz führen (Kuck und Mehl (2003) und Zitate darin). In phytopathogenen Pilzen wie den Mehлтаupilzen an Getreide und Gurke, *B. graminis* und *Podosphaera fusca* wurde in erster Linie die G143A Mutation als Resistenzauslöser gefunden (Avila-Adame et al., 2003).

Es ist bekannt, dass mitochondriale Heteroplasmie nicht ungewöhnlich ist. Dies wurde für verschiedene Eukaryonten gezeigt (Barr et al., 2005). Detaillierte Studien des pilzlichen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (Hnatova et al., 2003; Taylor et al., 2002) geben zu Bedenken, dass multiple Typen von Mitochondrien innerhalb einer Zelle einen Vorteil unter sich ändernden Umweltbedingungen bieten können (Smith et al., 1990).

Die Sequenzanalysen und CAPS-Assays zeigten deutlich, dass alle untersuchten Isolate des Apfelmehltaus heteroplasmatisch für die G143A-Mutation waren. Dieses galt nicht nur für Isolate, die erst kürzlich von intensiv Strobilurin-behandelten Anlagen in Sachsen gesammelt wurden, sondern auch für Isolate, die über einen Zeitraum von bis zu 6 Jahren *in vitro* ohne Fungizidbehandlung kultiviert wurden. Die Proportion der Strobilurin-resistenten, mutierten und der Strobilurin-sensitiven Mitochondrien-Wildformen unterschied sich zwischen Isolaten,

unabhängig von ihrer Herkunft (der Länder) und der Kultivierung ohne Fungizideinfluss. Die Trifloxystrobinsensitivität wurde für drei Referenzisolate in Sporenkeimtests und im Blattinfektionstest bestimmt. Es zeigte sich, dass die gefundenen Unterschiede klar mit dem Anteil der G143A mutierten Mitochondrien korreliert waren. Bei Isolat GB-43K2, bei dem der Anteil der mutierten Sequenzen über dem Anteil der Wildtypsequenzen lag (siehe Abbildung 12, Elektropherogramm) wurde eine deutliche Fungizidsensitivität festgestellt, die Isolate Ahr-11 und In6c, bei denen der Anteil der Wildtyp-Sequenzen überwog, reagierten deutlich sensitiv auf Fungizidbehandlung. In diesem Zusammenhang ist wichtig anzumerken, dass fast 20% der Konidien des Isolates GB-43K2, welches überwiegend die G143A-Mutation trägt, bei einer Fungizidkonzentration keimen konnten, die 10-fach höher war als die empfohlene Feldkonzentration.

Die Nachweisgrenzen für die unterschiedlichen mtDNA Typen sind für die einzelnen molekularen Methoden unterschiedlich hoch. Manche der Studien lassen vermuten, dass der beschriebene homoplasmatische Zustand auch ein unentdeckter heteroplasmatischer Zustand sein könnte. Im Gurkenmehltau *Podosphaera fusca* wurde ein resistentes Isolat gefunden, welche die sensitive Form des Cytochrom *b* trug (Ishii et al., 2001). In Ishiis Arbeit wurde nicht beschrieben, wieviele Sequenzen für jedes Isolat analysiert wurden, daher könnte es sein, dass dieses Isolat heteroplasmatisch war, aber mit der Mehrzahl an Mitochondrien des resistenten Genotyps, und damit einer hohen Resistenz gegenüber Strobilurin. Die Nachweisgrenze könnte eine Erklärung sein, warum nur die vorherrschende Form gefunden wurde. Bäumlner et al. (2003b) bestimmten die Nachweisgrenzen für verschiedene Methoden der Bestimmung der G143A Mutation in *B. graminis* f.sp. *tritici*. Für den CAPS-Verdau bestimmten sie eine Nachweisgrenze von 10-50 % für die Häufigkeit des resistenten Allels. Für *P. leucotricha* wurde sowohl in Sequenzanalysen, als auch mit dem CAPS-Nachweis jeweils eine ausreichende Menge an beiden Allelen zum Nachweis gefunden, also mindestens 10%, wobei die überwiegende Form für verschiedene Isolate variierte.

Zheng et al. (2000) haben Heteroplasmie für den Apfelschorf *Venturia inaequalis* beschrieben und zeigten, dass bei Kultur der Strobilurin-resistenten Mutanten auf fungizidfreiem Medium schon nach zwei Vermehrungszyklen die deutliche Mehrheit der Mitochondrien bereits wieder die Wildtyp-Cytochrom *b*-Sequenz trugen. Dies wurde unter konstantem Einfluss von Strobilurinen nicht beobachtet. Die Umwandlung der heteroplasmatischen Isolate zurück zum Wildtyp in Abwesenheit von Strobilurin lässt einen Fitnessvorteil des Wildtyps vermuten. Virulenztestungen mit *B. graminis* f.sp. *tritici* zeigten zwar keinen signifikanten Fitnessverlust der Strobilurin-resistenten Isolate (Barr et al., 2005; Sierotzki et al., 2005), jedoch wurde auch in diesem Pilz nach ausgedehnter fungizidfreier Kultur (über 30 Generationen) eine Umwandlung zurück zum Wildtyp der Cytochrom *b*-

Sequenz gefunden (Fraaje et al., 2002). Diese Daten deuten darauf hin, dass, obwohl die Virulenz der Isolate nicht direkt betroffen war, auf lange Sicht die G143A zu einem geringen Fitnessverlust und damit zu einem Nachteil führen kann. Das in dieser Arbeit verwendete Isolat GB-43K2 wurde über ca. 50 Generationen fungizidfrei kultiviert. Auch nach dieser langen Dauer waren immer noch hohe Anteile an mutierten Mitochondrien zu finden und das Isolat zeigte eine stark reduzierte Sensitivität gegenüber Trifloxystrobin. Somit scheinen die Mitochondrien, die die G143A in ihrem Cytochrom *b*-Gen tragen, unter den verwendeten *In vitro*-Bedingungen keinen Fitnessnachteil zu erleiden. Unter Feldbedingungen, d.h. auch unter dem Einfluss von Fungiziden mit einer anderen Wirkungsweise als die der Qols oder in Anwesenheit von Mikroben, die toxische Sekundärstoffe produzieren (Thines et al., 2006), könnte die G143A Mutation nebensächlich werden.

Fungizidresistenzen in phytopathogenen Pilzen haben sich oftmals schon bald nach der Einführung neuer "Single-target" Wirkstoffe gezeigt (einen Überblick hierüber geben Deising et al. (2002) und Staub (1991)). Als eines der besten Beispiele gilt die Strobilurinresistenz, die bereits zwei Jahre nach Einführung der Wirkstoffe in den Markt auftrat (Appel und Felsenstein, 2000). Ein Versagen der Kontrolle des Apfelmehltaus mit Strobilurin-Fungiziden wurde bereits in verschiedenen Regionen in Europa beobachtet und das Verständnis der molekularen Grundlagen der Resistenz ist essentiell, um ein geeignetes Programm zur Verhinderung der Bildung von Resistenzen zu entwickeln. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei die Beobachtung in diesen Experimenten, dass die G143A-Mutanten des Apfelmehltau, im Gegensatz zu anderen Mehлтаupilzen, anscheinend keinen Fitnessverlust erleiden. Daher sollten zur Kontrolle des Apfelmehltaus Fungizide eingesetzt werden, die einen anderen Wirkungsmodus haben. Eine detaillierte Auflistung geeigneter Wirkstoffe aus verschiedenen Klassen ist bei Deising et al. (2002) zu finden. Ein geeignetes Bekämpfungsprogramm sollte entwickelt werden, welches auch die Kontrolle von Strobilurin-resistenten Isolaten des Apfelmehltau ermöglicht. Altbekannte Aussagen von Köller und Scheinpflug (1987) sind auch heute noch von Bedeutung: Resistenz-gefährdete Wirkstoffe sollten nur in Mischung mit Fungiziden anderer Wirkstoffklassen angewendet werden. (Die Anwendungsempfehlungen für das Pflanzenschutzmittel Flint im Kernobstanbau sind folgende: ausschließlich in Tankmischung mit einem Kontaktfungizid anzuwenden, z.B. Euparen; nur 3 mal pro Saison zu verwenden, nur 2 mal unmittelbar aufeinanderfolgend; Anwendungskonzentration 50 mg/l). Dieses ist schon vor einem Auftreten erster Resistenzen wichtig, sinnvollerweise gleich bei der Einführung eines Wirkstoffes in den Markt. Berichte über adaptive Mutationen, die Antibiotikaresistenzen bewirken (Martinez und Baquero, 2000; Rosenberg, 2001) und über schnell auftretende und sich ausbreitende Fungizidresistenzen sollten als Warnung verstanden werden und zur Entwicklung sorgfältiger Bekämpfungstrategien führen (Deising et al., 2002; Reimann und Deising, 2005).

## **6 Zusammenfassung**

Das Ziel dieser Arbeit war es, relevante Informationen über die Variabilität des Apfelmehltau zu erlangen, um diese in der Resistenzzüchtung beim Apfel zu nutzen. Dabei wurde zum einen die Virulenz einer Auswahl von Isolaten auf einem *Malus*-Sortiment getestet, zum anderen wurden Proben des Pathogens auf molekularer Ebene mit Markern untersucht, um die genetische Variabilität festzustellen. Ein dritter Teil der Arbeit befasste sich mit der Untersuchung, ob die in anderen Pathogenen auftretende Strobilurin-Fungizid-Resistenz (G143A), die auf einer Mutation im Pathogen beruht, auch beim Apfelmehltau auftritt.

Zwölf Isolate von *Podosphaera leucotricha* wurden auf einem Sortiment von 41 *Malus*-Genotypen getestet. Anfällige Kontrollsorten wurden in erster Linie mit Genotypen verglichen, die die beschriebenen Mehltaresistenzen tragen, desweiteren mit Wildarten und Sorten, die als resistent oder gering anfällig gelten. Bei den Testungen hat sich gezeigt, dass alle zwölf Mehltau-Isolate sich in ihrer Virulenz unterscheiden. Somit erscheint die Variabilität als sehr hoch. Auch Isolate, die aus einer Knospe stammten, waren deutlich unterschiedlich. Auf der Pflanzenseite haben die Versuche gezeigt, dass die beschriebenen Resistenzen in D12 (*PI<sub>d</sub>*), MIS (*PI<sub>mis</sub>*) und 'White Angel' (*PI<sub>w</sub>*) gegenüber den getesteten Isolaten voll wirksam waren, es konnten keine Infektionen stattfinden. Anders sah die Situation bei den Resistenzen aus *M. x robusta* (*PI<sub>1</sub>*) und *M. zumi* (*PI<sub>2</sub>*) aus. Die Referenzgenotypen für diese Resistenzen (A142/5 und *M. zumi* 274) konnten von fast allen Isolaten infiziert werden, die Resistenzen wurden deutlich überwunden. Auch in der Literatur wurde berichtet, dass schon im Feld virulente Isolate auf *PI<sub>1</sub>*- und *PI<sub>2</sub>*-Genotypen auftraten. Neben den Referenzgenotypen wurden Nachkommen einer Kreuzung zwischen einem *PI<sub>1</sub>*- und einem *PI<sub>2</sub>*-Träger getestet, die die Gene teilweise in Kombination tragen. Es hat sich gezeigt, dass diese deutlich unterschiedlich zu den Referenzgenotypen reagierten: Genotypen mit den einzelnen Genen zeigten zwar Befall, waren aber weniger anfällig als die Referenzen. Die Genotypen, die beide Gene in Kombination trugen, waren weitgehend resistent. Die Ergebnisse machen wahrscheinlich, dass die *PI<sub>1</sub>*- und *PI<sub>2</sub>*-Resistenzen nicht monogen bedingt sind, sondern durch mehrere Gene in Interaktion wirken. Das Pyramidisieren von Resistenzgenen scheint eine wirksame Methode zu sein, um Pflanzen vor virulenten Isolaten zu schützen, selbst wenn die einzelnen Resistenzgene bereits wirkungslos geworden sind. Dabei scheinen additive Effekte der verschiedenen Gene zusätzlichen Schutz zu bieten.

Es wurden molekulare AFLP-Marker entwickelt, mit denen eine Sammlung von 27 Isolaten aus Europa, China und Indien untersucht werden konnte. Der auf den Markerdaten basierende Stammbaum unterteilt die Isolate in zwei getrennte Hauptgruppen, wobei keine offensichtliche Korrelation zu Herkunft, Primär- oder Sekundärbefall oder dem Grad der

Aggressivität der Isolate erkennbar war. Wodurch die Unterteilung in diese zwei Gruppen bedingt ist, ist unklar. Auffällig war, dass die Isolate in Gruppe 1 sehr viel mehr Homogenität aufwiesen als die der Gruppe 2. Auch Feldproben von verschiedenen Standorten in Europa, China und Indien, die mit RAPD- und SCAR-Markern untersucht wurden, wiesen die Aufteilung der Proben in zwei getrennte Gruppen auf, dabei war Gruppe 2 in diesem Fall in zwei deutliche Untergruppen unterteilt, deren eine (2-2) nur Feldproben und keins der Isolate enthielt. Ähnlichkeiten dieser Ergebnisse mit Erkenntnissen über den Rebenmehltau wurden diskutiert.

Hinsichtlich der Fungizidresistenz war es das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob eine Mutation im Cytochrom *b*-Gen von *P. leucotricha* zu Resistenz gegenüber Strobilurin-Fungiziden führt, wie es bei anderen Pflanzenpathogenen beobachtet wurde. Die Untersuchungen auf molekularer Ebene zeigten eine hohe Variabilität in der betreffenden Region des Genes. Alle getesteten Isolate waren heteroplasmatisch für die G143A-Mutation. Dies galt sowohl für Isolate die erst kürzlich von Strobilurin-behandelten Bäumen gewonnen wurden, als auch für solche, die bereits mehrere Jahre ohne Fungizide in Kultur gehalten worden waren. Der Anteil von resistenten und Wildtyp-Formen innerhalb eines Isolates variierte zwischen verschiedenen Isolaten, unabhängig von ihrer Herkunft. Sensitivitätstests und Keimtests mit Trifloxystrobin für drei Isolate zeigte auch Unterschiede in der Reaktion der Isolate gegenüber dem Fungizid. Ein Isolat war fähig, unter sehr viel höheren Konzentrationen des Fungizides zu wachsen als die beiden anderen. Bei einer Konzentration, die 10-fach höher war als die empfohlene Feldkonzentration, konnte immer noch 18% Keimung beobachtet werden. Aufgrund der hier gewonnenen Daten scheint die G143A-Mutation im Apfelmehltau weit verbreitet zu sein, jedoch möglicherweise unabhängig von der Anwendung von Strobilurin-Fungiziden. In der Regel führt erst eine häufige Anwendung von Fungiziden zu der Entwicklung oder Selektion von resistenten Formen. Um eine Selektion besonders resistenter Formen zu vermeiden, sollten die Richtlinien zur Anwendung der Strobilurine streng eingehalten werden, d.h. Einsatz der Mittel nur in Kombination mit Kontaktfungiziden und eine Vermeidung wiederholter Anwendungen.

## 7 Summary

The objective of this work was to gain new information about the variability of apple powdery mildew relevant for their usage in apple resistance breeding. A selection of isolates has been tested for their virulence on a collection of *Malus*-genotypes and greater numbers of samples of the pathogen have been screened with molecular markers for their variability. A third part of this work was concentrated on the question whether the strobilurin-fungicide-resistance G143A, which can be found in other pathogens, is also present in apple powdery mildew.

Twelve isolates of *Podosphaera leucotricha* have been tested on a collection of 41 *Malus*-genotypes. The collection included, besides susceptible controls, mostly genotypes which are known to carry well described mildew resistance genes but also wild species and cultivars which are considered to be resistant or moderately susceptible. The tests have shown that all isolates differ in their virulence and thus proved the variability to be quite high. Also isolates differed clearly although they originated from a single bud. On the plant side the experiments have confirmed the effectiveness of the known resistances in the genotypes D12 (*PId*), MIS (*PImis*) and 'White Angel' (*PIw*). No infection has been observed on these genotypes with the tested isolates. The results for the resistances from *M. x robusta* (*PI1*) and *M. zumi* (*PI2*) were different. The reference genotypes for these major resistances (A142/5 and *M. zumi* 274) could be infected by most of the isolates, the resistances were clearly overcome. Similar findings of virulent isolates on *PI1*- and *PI2*-genotypes in the field have been published. Apart from the reference genotypes also progeny of a cross between *PI1*- and *PI2*-genotypes have been tested, which partly carry the resistance genes in combination. The results showed that these plants reacted differently than the reference genotypes: plants with the single genes also showed infection but were less susceptible. Genotypes which carried the two genes in combination were in contrast mainly resistant. These results suggest that the *PI1*- and *PI2*-resistances are probably not monogenic but the result of several interacting genes. Pyramiding of resistances appears to be an effective method to protect plants from virulent isolates even if the single resistances have been overcome. Possibly additive effects from the different genes offer the additional protection against the pathogen.

Molecular AFLP-markers have been developed and applied on a collection of 27 isolates from Europe, China and India. Pedigrees have been produced based on the marker data which separate the isolates into two distinct groups. There has been no clear correlation between origin of the isolates, primary or secondary infection type or degree of aggressiveness. It is unclear by what the determination into the two groups is caused. It was noticeable that isolates in group 1 showed much more homogeneity than isolates in group 2.

Moreover, field samples from different locations in Europe, China and India have been analysed with RAPD- and SCAR-markers and showed the same division into two separate groups, of which group 2 appeared subdivided into two subgroups. Subgroup 2-2 included only field samples and no isolates. Similarities between these results and findings for grape powdery mildew have been discussed.

Regarding the fungicide resistance the objective of this work was to find out whether a mutation in the mitochondrial cytochrome *b*-gene of *P. leucotricha* leads to resistance against strobilurin fungicides, as has been shown for other pathogens. Molecular analyses showed a high variability in the corresponding region of the gene. All isolates tested were heteroplasmatic for the G143A-mutation. This has been shown both for isolates sampled from trees recently treated with strobilurin fungicides and for isolates which have been cultivated without fungicide contact for several years. The proportion of resistant and wildtype forms within a single isolate varied between the isolates regardless to their origin. Sensitivity tests and germination tests with three isolates also showed differences in the reaction to the fungicide. One isolate has been able to grow under much higher fungicide concentrations than the two others. At a concentration ten times higher than the recommended field concentration still 18% of the spores were able to germinate. The results suggest that the G143A-mutation is prevalent in apple powdery mildew but maybe independent from a previous application of strobilurin fungicides. Normally the frequent application of fungicides leads to development or selection of resistant forms of the pathogens. To prevent the selection of highly resistant strains the guidelines for fungicide application should be followed strictly: strobilurins should be used only in combination with contact fungicides and repeated application should be avoided.

## **8      Literaturverzeichnis**

- Agrios, G.N.** (2005): Plant Pathology. Elsevier, Burlington, USA.
- Alston, F. H.** (1976): Practical aspects of breeding for mildew (*Podosphaera leucotricha*) resistance in apples. In: Proceedings of the Eucarpia Meeting of Fruit Tree Breeding, Wageningen, Niederlande, 7.-10.09.1976.
- Andrison, D.** und de Vallavielle-Pope, C. (1993): Racial diversity and complexity in regional populations of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* in France over a 5-year period. Plant Pathology 42: 443-464.
- Appel, J.** und Felsenstein, F. G. (2000): Entwicklung der Strobilurinresistenz des Weizenmehltaus in Europa in den Jahren 1998 bis 2000. Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt 376: 97.
- Avila-Adame, C.** und Köller, W. (2003): Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. Current Genetics 42: 332-338.
- Avila-Adame, C.,** Olaya, G., und Köller, W. (2003): Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobilurin-related QoI fungicides. Plant Disease 87: 1426-1432.
- Aylor, D. E.** (1986): A framework for examining inter-regional aerial transport of fungal spores. Agricultural and Forest Meteorology 38: 263-288.
- Bardin, M.,** Carlier, J., und Nicot, P. C. (1999): Genetic differentiation in the French population of *Erysiphe cichoracearum*, a causal agent of powdery mildew of cucurbits. Plant Pathology 48: 531-540.
- Bardin, M.,** Nicot, P. C., Normand, P., und Lemaire, J. M. (1997): Virulence variation and DNA polymorphisms in *Sphaeroteca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbits. European Journal of Plant Pathology 103: 545-554.
- Barr, C. M.,** Neiman, M., und Taylor, D. R. (2005): Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. New Phytologist 168: 39-50.
- Bartlett, D. W.,** Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., und Parr-Dobrzanski, B. (2002): The strobilurin fungicides. Pest Management Science 58: 649-662.
- Battle, I.** und Alston, F. H. (1996): Genes determining leucine aminopeptidase and mildew resistance from the ornamental apple, 'White Angel'. Theoretical and Applied Genetics 93: 179-182.
- Bäumler, S.,** Felsenstein, F. G., und Schwarz, G. (2003a): CAPS and DHPLC analysis of a single nucleotide polymorphism in the cytochrome *b* gene conferring resistance to strobilurins in field isolates of *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. Journal of Phytopathology 151: 149-152.
- Bäumler, S.,** Sierotzki, H., Gisi, U., Mohler, V., Felsenstein, F. G., und Schwarz, G. (2003b): Evaluation of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* field isolates for resistance to strobilurin fungicides with different SNP detection systems. Pest Management Science 59: 310-314.

- Bäumler, S.** (2004): Entwicklung und Validierung von molekularen Markersystemen für QoI-Fungizidresistenzen bei pilzlichen Phytopathogenen. Dissertation Technische Universität München.
- Benting, J., Häuser-Hahn, I., Nauen, R., und Beffa, R.** (2004): Molecular diagnosis of resistance. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 57: 78-86.
- Berwith, C. E.** (1936): Apple powdery mildew. *Phytopathology* 26: 1071-1073.
- Bevan, J. R., Crute, I. R., und Clarke, D. D.** (1993): Variation for virulence in *Erysiphe fischeri* from *Senecio vulgaris*. *Plant Pathology* 42: 622-635.
- Blazek, J.** (2004): Pre-selection of apple seedlings for partial powdery mildew (*Podosphaera leucotricha* Ell. et Ev./Salm.) resistance. *Plant Soil and Environment* 50: 65-69.
- Bouscaut, J. und Corio-Costet, M.-F.** (2007): Detection of a specific transposon in *Erysiphe necator* from grapevines in France. *Journal of Phytopathology* 155: 381-383.
- Bousset, L., Hovmøller, M. S., Caffier, V., de Vallavielle-Pope, C., und Østergård, H.** (2002): Observed and predicted changes over eight years in frequency of barley powdery mildew avirulent to spring barley in France and Denmark. *Plant Pathology* 51: 33-44.
- Boyd, L. A.** (2006): Can the durability of resistance be predicted? *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 2523-2526.
- Brown, J. K. M.** (1994): Chance and selection in the evolution of barley mildew. *Trends in Microbiology* 2: 470-475.
- Brown, J. K. M.** (1995): Pathogens' response to the management of disease resistance genes. *Advances in Plant Pathology* 11: 75-102.
- Brown, J. K. M.** (2000): Estimation of rates of recombination and migration in populations of plant pathogens. *Phytopathology* 90: 320-323.
- Brown, J. K. M. und Simpson, C. G.** (1994): Genetic analysis of DNA fingerprints and virulences in *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Current Genetics* 26: 172-178.
- Burdon, J. J.** (1993): Genetic variation in pathogen populations and its implications for adaptation to host resistance, Seiten 41-56. In: Jacobs, T. und Parlevliet, J. E. (Eds.): Durability of disease resistance. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Bus, V.G.M., Ranatunga, C., Gardiner, S. E., Bassett, H., und Rikkerink, E.** (2000): Marker assisted selection for pest and disease resistance in the New Zealand apple breeding programme. *Acta Horticulturae* 538: 541-547.
- Bus, V.G.M., Bassett, H.C.M., Bowatte, D., Chagné, D., Ranatunga, C.A., Ulluwishewa, D., Wiedow, C. und Gardiner, S.E.** (2010): Genome mapping of an apple scab, a powdery mildew and a woolly apple aphid resistance gene from open-pollinated Mildew Immune Selection. *Tree Genetics and Genomes* 6: 477-487.
- Büttner, R., Geibel, M., und Fischer, C.** (1999): Das genetische Potential an Schorf- und Mehlttauresistenz in *Malus*-Wildarten. *Erwerbsobstbau* 41: 102-105.
- Caffier, V., de Vallavielle-Pope, C., und Brown, J. K. M.** (1996): Segregation of avirulences and genetic basis of infection types in *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Phytopathology* 86: 1112-1121.

- Caffier, V.** und Laurens, F. (2005): Breakdown of *PI2*, a major gene of resistance to apple powdery mildew, in a french experimental orchard. *Plant Pathology* 54: 116-124.
- Caffier, V.** und Parisi, L. (2007): Development of apple powdery mildew on sources of resistance to *Podosphaera leucotricha*, exposed to an inoculum virulent against the major resistance gene *PI-2*. *Plant Breeding* 126: 319-322.
- Calenge, F.** und Durel, C.E. (2006): Both stable and unstable QTLs for resistance to powdery mildew are detected in apple after four years of field assessments. *Molecular Breeding* 17: 329- 339.
- Chin, K. M.,** Chavaillaz, D., Kaesbohrer, M., Staub, T., und Felsenstein, F. G. (2000): Characterizing resistance risk of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* to strobilurins. *Crop Protection* 20: 87-96.
- Chin, K. M.,** Wirz, M., und Laird, D. (2001): Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Disease* 85: 1264-1270.
- Cimanowski, J.** (1970): Resistance of apple to powdery mildew and its relationship to osmotic activity of the cell sap. *Phytopathology* 60: 1848-1849.
- Clarke, D.D.** und Akhkha, A. (2002): Population genetics of powdery mildew-natural plant pathosystems, Seiten 200-218. In: Bélanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J. und Carver, T.L.W. (Eds.): *The powdery mildews- a comprehensive treatise*. APS Press, St.Paul, USA.
- Cohen, R.,** Burger, Y., und Katzir, N. (2004): Monitoring physiological races of *Podopshaera xanthii* (syn. *Sphaeroteca fuliginea*) the causal agent of powdery mildew in cucurbits: Factors affecting race identification and the importance for research and commerce. *Phytoparasitica* 32: 174-183.
- Cortesi, P.,** Mazzoleni, A., Pizzatti, C., und Milgroom, M. G. (2005): Genetic similarity of flag shoot and ascospore subpopulations of *Erysiphe necator* in Italy. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7788-7791.
- Cortesi, P.,** Ottaviani, M.-P., und Milgroom, M. G. (2004): Spatial and genetic analysis of a flag shoot subpopulation of *Erysiphe necator* in Italy. *Phytopathology* 94: 544-550.
- Coyier, D. L.** (1974): Heterothallism in the apple powdery mildew fungus, *Podosphaera leucotricha*. *Phytopathology* 64: 246-248.
- Dangl, J. L.** und Jones, J. D. G. (2001): Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- Dayton, D. F.** (1977): Genetic immunity to apple mildew incited by *Podopshaera leucotricha*. *HortScience* 12: 225-226.
- Debener, T.** und Matthiesch, L. (1998): Effective pairwise combination of long primers for RAPD analyses in roses. *Plant Breeding* 117: 147-151.
- Deising, H. B.,** Reimann, S., Peil, A., und Weber, W. E. (2002): Disease management of rusts and powdery mildews, Seiten 243-269. In: Esser, K. und Bennett, J.W. (Eds.): *The Mycota XI, Agricultural Applications*, Springer Verlag, Berlin.
- del Pino, D.,** Olalla, L., Perez-Garcia, A., Rivera, M. E., Garcia, S., Moreno, R., de Vicente, A., und Tores, J. A. (2002): Occurrence of races and pathotypes of cucurbit powdery mildew in southeastern Spain. *Phytoparasitica* 30: 459-466.

- Delye, C.** und Corio-Costet, M.-F. (2005): Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator*. RAPD analysis discriminates two biotypes. *Mycological Research* 102: 283-288.
- Delye, C.**, Corio-Costet, M.-F., und Laigret, F. (1995): A RAPD assay for strain typing of the biotrophic grape powdery mildew fungus *Uncinula necator* using DNA extracted from the mycelium. *Experimental Mycology* 19: 234-237.
- Delye, C.**, Laigret, F., und Corio-Costet, M.-F. (1997): RAPD analysis provides insight into the biology and epidemiology of *Uncinula necator*. *Phytopathology* 87: 670-677.
- De Wit, P.J.G.M.** (1992): Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 30: 391-418.
- Doyle, A.** (2004): Evolution of fungicide resistance. *Crop Protection* 17: 12-17.
- Dunemann, F.**, Bräcker, G., Markussen, T., und Roche, P. (1999): Identification of molecular markers for the major mildew resistance gene *PI2* in apple. *Acta Horticulturae* 484: 411-416.
- Dunemann, F.**, Peil, A., Urbanietz, A., und Garcia-Mas, J. (2007): Mapping of the apple powdery mildew resistance gene *PI1* and its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene. *Plant Breeding* 126: 476-481.
- Dunemann, F.** und Schuster, M. (2009): Genetic characterization and mapping of the major powdery mildew resistance gene *PIbj* from *Malus baccata jackii*. *Acta Horticulturae* 814: 791-796.
- Dunemann, F.**, Urbanietz, A., Gardiner, S. E., Bassett, H., Legg, W., Rushome, R., Bus, V., und Ranatunga, C. (2004): Marker assisted selection for *PI-1* powdery mildew resistance in apple- old markers for a new resistance gene? *Acta Horticulturae* 663: 757-762.
- Dutech, C.**, Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barrès, B., Carlier, J., Tharreau, D., und Giraud, T. (2007): Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 44: 933-949.
- Ellis, M. A.** und Ferree, D. C. (1981): Photosynthesis, transpiration, and carbohydrate content of apple leaves infected by *Podosphaera leucotricha*. *Phytopathology* 71: 392-395.
- Evans, K. M.** und James, C. M. (2002): Identification of SCAR markers linked to *PI-w* mildew resistance in apple. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1178-1183.
- Felsenstein, F. G.** und Jaser, B. (2000): Effectiveness of qualitative powdery mildew resistance in wheat and barley and sensitivity of fungal cereal pathogens towards different compounds. Bericht der Epilogic GmbH für Agrobiologische Forschung und Beratung, Freising-Weihenstephan. [www.epilogic.de](http://www.epilogic.de).
- Fischer, D.** und Bachmann, K. (1998): Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). *BioTechniques* 24: 796-802.
- Fischer, M.** und Fischer, C. (1999): Evaluation of *Malus* species and cultivars at the Fruit Genebank Dresden-Pillnitz and its use for apple resistance breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 235-241.

- Fisher, N.**, Brown, A. C., Sexton, G., Cook, A., Windass, J., und Meunier, B. (2004): Modelling the Qo site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *b*. *European Journal of Biochemistry* 271: 2264-2271.
- Flor, H. H.** (1942): Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32: 653-669.
- Fournier, E.** Giraud, T., Albertini, C., und Brygoo, Y. (2005): Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* 97: 1251-1267.
- Fraaje, B. A.**, Butters, J. A., Coelho, J. M., Jones, D. R., und Hollomon, D. W. (2002): Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathology* 51: 45-54.
- Frey, J. E.**, Frey, B., Sauer, C., und Kellerhals, M. (2004): Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for marker-assisted selection in breeding. *Plant Breeding* 123: 554-557.
- Friedrich, G.** und Rode, H. (1996): Pflanzenschutz im integrierten Obstbau. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Gallian, J. J.**, Nolte, P., und Miller, J. S. (2005): Managing fungicide resistance. [www.uidaho.edu/sugarbeet/managingfungresist.htm](http://www.uidaho.edu/sugarbeet/managingfungresist.htm)
- Gallot, J. C.**, Lamb, R. C., und Aldwinckle, H. (1985): Resistance to powdery mildew from some small-fruited *Malus* cultivars. *HortScience* 20: 1085-1087.
- Gardiner, S. E.**, Bus, V., Bassett, H., Goodman, M., Greer, L., Ranatunga, C., Rikkerink, E., und Forster, R. (1999): Identification of molecular markers linked to major resistances to apple scab, powdery mildew, and woolly apple aphid in apple. In: Abstracts of the Plant & Animal Genome VII Conference, San Diego, USA.
- Gardiner, S. E.**, Bus, V. G. M., Rusholme, R. L., Chagné, D., und Rikkerink, E. H. A. (2007): Apple, Seiten 1-62. In: Chittaranjan Kole (Ed.): *Genome mapping and molecular breeding in plants: fruits and nuts*. Springer Verlag, Berlin.
- Gardiner, S. E.**, Rikkerink, E., Meech, S., Murdoch, J., Bassett, H., Bus, V., Cook, M., Gleave, A., und Crowhurst, R. (2002): Targeted resistance gene mapping in apple using resistance gene analogues from an EST database. In: Abstracts of the Plant & Animal Genome X Conference, San Diego, USA.
- Gardiner, S. E.**, Rusholme, R. L., Bassett, H., Bus, V., Legg, W., Cook, M., Ranatunga, C., Rikkerink, E., Gleave, A., und Crowhurst, R. (2004): Conservation of markers around some genes in apple. In: Abstracts of the Plant & Animal Genomes XII Conference, San Diego, USA.
- Gessler, C.**, Suhner, S., Dorn, B., und Koller, B. (2000): Genetic diversity of the apple mildew fungus *Podosphaera leucotricha*: DNA-markers give surprising results, artefacts or relevant role of sexuality? *IOBC wprs Bulletin* 23: 105-109.
- Gessler, C.**, Patocchi, A., Sansavini, S., Tartarini, S. und Gianfranceschi, L. (2006): *Venturia inaequalis* resistance in apple. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 473-503.
- Gianfranceschi, L.**, Seglias, N. P., Kellerhals, M., und Gessler, C. (1999): Molecular markers applied to apple breeding: analysis of oligogenic and single gene resistances. *Acta Horticulturae* 484: 417-428.

- Gisi, U.**, Chin, K. M., Knapova, G., Küng Färber, R. B., Mohr, U., Sierotzki, H., und Steinfeld, U. (2000): Recent developments in elucidating modes of fungicide resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Protection* 19: 863-872.
- Gisi, U.**, Sierotzki, H., und McCafferey, A. (2002): Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58: 859-867.
- Gladieux, P.**, Zhang, X.-G., Afoufa-Bastien, D., Valdebenito Sanhueza, R.-M., Sbaghi, M., und Le Cam, B. (2008): On the origin and spread of the scab disease of apple: out of central Asia. *PLoS ONE* 3: e1455.
- Green, J. R.**, Carver, T. L. W., und Gurr, S. J. (2002): The formation and function of infection and feeding structures, Seiten 66-82. In: Belanger, R. R., Bushnell, W. R., Dik, A. J., und Carver, T. L. W. (Eds.): *The powdery mildews- A comprehensive treatise*. APS Press, St. Paul, USA.
- Hammond-Kosack, K. E.** und Parker, J. E., (2003): Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 177-193.
- Hanke, V.** (1994): Plant regeneration from tissue cultures of *Malus* species: the importance of the genotype, Seiten 365-369. In: Schmidt, H. und Kellerhals, M. (Eds.): *Progress in temperate fruit breeding*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Hausner, G.** (2003): Fungal mitochondrial genomes, plasmids and introns, Seiten 101-131. In: Arora, D. (Ed.): *Applied mycology and biotechnology vol 3, Fungal genomics*. Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande.
- He, C.**, Nourse, J. P., Irwin, J. A. G., Manners, J. M., und Kelemu, S. (1996): *CgT1*: a non-LTR retrotransposon with restricted distribution in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecular and General Genetics* 252: 320-331.
- Hnatova, M.**, Gbelska, Y., Obernauerovy, M., Subikova, V., und Subik, J. (2003): Cross-resistance to strobilurin fungicides in mitochondrial and nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica (Praha)* 48: 496-500.
- Hoffmann, G. M.**, Nienhaus, F., Poehling, H.-M., Schönbeck, F., Weltzien, H. C., und Wilbert, H. (1994): *Lehrbuch der Phytomedizin*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.
- Horbach, R.**, Reimann, S., und Deising, H. B. (2004): Fungizid induzierte Genexpression in *Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson. DPG Arbeitskreistagung Phytopharmakologie. *Phytomedizin* 34, 75-76.
- Huang, N.**, Angeles, E. R., Domingo, J., Magpantay, G., Singh, S., Zhang, G., Kumaravadivel, N., Bennet, J., und Khush, G. S. (1997): Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 313-320.
- Ishii, H.**, Fraaje, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T., und Hollomon, D. W. (2001): Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91: 1166-1171.
- James, C. M.**, Clarke, J. B., und Evans, K. M. (2004): Identification of molecular markers linked to the mildew resistance gene *Pl-d* in apple. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 175-181.

- James, C. M.** und Evans, K. M. (2004): Identification of molecular markers linked to the mildew resistance genes *Pl-d* and *Pl-w* in apple. *Acta Horticulturae* 663: 123-127.
- James, C. M.**, Lesemann, S.S. und Down, G.J. (2003): Modified AFLP analysis method for species with small genomes. *Plant Molecular Biology Reporter* 21:303-307.
- Janse, J.**, Verhaegh, J.J. und Den Nijs, A.P.M. (1994): Early selection for partial resistance to powdery mildew, *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) in apple progenies. *Euphytica* 77: 7-9.
- Jeger, M. J.** und Butt, D. J. (1986): Epidemics of apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) in a mixed cultivar orchard. *Plant Pathology* 35: 498-505.
- Jeger, M. J.**, Butt, D. J., und Swait, A. A. J. (1986): Components of resistance of apple to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*). *Plant Pathology* 35: 477-490.
- Jørgensen, J. H.** (1988): *Erysiphe graminis*, powdery mildew of cereal and grasses. *Advances in Plant Pathology* 6: 137-157.
- Karaoglu, H.**, Lee, C. M. Y., und Meyer, W. (2004): Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. *Molecular Biology and Evolution* 22: 639-649.
- Kaspers, H.** (1967): Ein Beitrag zur Biologie und Bekämpfung des Apfelmehltaus (*Podosphaera leucotricha* [Ell. & Ev.] Salm). *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 4: 689-703.
- Kellerhals, M.** und Furrer, B. (1994): Approaches for breeding apples with durable disease resistance. *Euphytica* 77: 31-35.
- Kellerhals, M.**, Sauer, C., Guggenbuehl, B., Gantner, S., Frey, B., Frey, J. E., Patocchi, A., und Gessler, C. (2004): Apple breeding for high fruit quality and durable disease resistance. *Acta Horticulturae* 663: 751-756.
- Kim, Y. S.**, Dixon, E. W., Vincelli, P., und Farman, M. L. (2003): Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Phytopathology* 93: 891-900.
- Klocke, B.** (2004): Virulenzstruktur und -dynamik des Roggenbraunrostes (*Puccinia recondita* f.sp. *secalis*) in der Bundesrepublik Deutschland. Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Kloppers, F. J.** und Pretorius, Z. A. (1997): Effects of combinations amongst genes *Lr13*, *Lr34* and *Lr37* on components of resistance in wheat to leaf rust. *Plant Pathology* 46: 737-750.
- Knight, R. L.** und Alston, F. H. (1968): Sources of field immunity to mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 10: 294-298.
- Koch, T.**, Kellerhals, M., und Gessler, C. (2000): Virulence pattern of *Venturia inaequalis* field isolates and corresponding differential resistance in *Malus x domestica*. *Journal of Phytopathology* 148: 357-364.
- Koller, B.**, Gessler, C., Bertschinger, L., und Kellerhals, M. (1995): Technikfolgen des Einsatzes gentechnisch veränderter krankheitsresistenter Nutzpflanzen. Teil Apfel. Report der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau Wädenswil, Schweiz.

- Köller, W.**, Parker, D. M., Turechek, W. W., Avila-Adame, C., und Cronshaw, K. (2004): A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. *Plant Disease* 88: 537-544.
- Köller, W.** und Scheinpflug, H. (1987): Fungal Resistance to Sterol Biosynthesis Inhibitors: A New Challenge. *Plant Disease* 71: 1066-1074.
- Korban, S. S.** und Dayton, D. F. (1983): Evaluation of *Malus* germplasm for resistance to powdery mildew. *HortScience* 18: 219-220.
- Krieghoff, O.** (1995): Entwicklung einer In-vitro-Selektionsmethode auf Resistenz von *Malus*-Genotypen gegenüber *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm. und In-vitro-Differenzierung von Virulenzunterschieden des Erregers. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin.
- Krüger, J.** (1994): Observations on different mildew sources used in apple breeding at Ahrensburg. *Euphytica* 77: 1-6.
- Kuck, K.-H.** und Mehl, A. (2003): Trifloxystrobin: Resistance risk and resistance management. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 56: 313-325.
- Küng Färber, R. B.**, Chin, K. M., und Leadbitter, N. (2002): Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin. *Pest Management Science* 58: 261-267.
- Kunz, S.**, Lutz, B., Deising, H. B., und Mendgen, K. (1997): Assessment of sensitivities to Anilinopyrimidine- and Strobilurin-fungicides in populations of the apple scab fungus *Venturia inaequalis*. *Journal of Phytopathology* 146: 231-238.
- Lalancette, N.** und Hickey, K. D. (1985): Apple powdery mildew disease progress on sections of shoot growth: an analysis of leaf maturation and fungicide effects. *Phytopathology* 75: 130-134.
- Landsmann, C. A.**, von Kietznel, J.-R., und Flynn, D. J. (1998): The work of the ECCO-Team (BBA) and (PSD) in the implementation of Council Directive 91/414/EEC: background, present situation, aims (part one). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 50: 49-52.
- Lannou, C.** (2001): Intrapathotype diversity for aggressiveness and pathogen evolution in cultivar mixtures. *Phytopathology* 91: 500-510.
- Laurens, F.** (1999): Review of the current apple breeding programmes in the world: objectives for scion cultivar improvement. *Acta Horticulturae* 484: 163-170.
- Lebreton, L.**, Lucas, P., Dugas, F., Guillerm, A.-Y., Schoeny, A., und Sarniguet, A. (2004): Changes in population structure of the soilborne fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* during continuous wheat cropping. *Environmental Microbiology* 6: 1174-1185.
- Lesemann, S. S.**, Dunemann, F., Schimpke, S. und Deising, H.B. (2006). Mitochondrial Hetroplasmie für den Cytochrom *b* Gen kontrolliert das Niveau der Strobilurin Resistenz in dem Apple Powdery Mildew Pilz *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) E.S. Salmon. *Journal of Plant Diseases and Protection* 113: 159-166.
- Lespinasse, Y.** (1983): Amelioration du pommier pour la resistance a l'oidium. *IOBC wprs Bulletin* 6: 96-110.

- Lespinasse, Y.** (1989): Breeding pome fruits with stable resistance to diseases. 3. Genes, resistance mechanisms, present work and prospects. IOBC wprs Bulletin 2: 100-115.
- Lespinasse, Y.**, Decourtye, L., und Renoux, A. (1976): Selecting minor genes in apple progenies for resistance to mildew (*Podopshaera leucotricha*). In: Proceedings of the Eucarpia Meeting of Fruit Tree Breeding, Wageningen, 7.-10.09.1976.
- Limpert, E.** und Bartoš, P. (2002): Wind-dispersed nomadic diseases: conclusions for disease resistance. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 38: 150-152.
- Linde, M.** und Debener, Th. (2003): Isolation and identification of eight races of powdery mildew of roses (*Podopshara pannosa*) (Wallr.:Fr.) de Bary and the genetic analysis of the resistance gene *Rpp1*. Theoretical and Applied Genetics 107: 256-262.
- Markussen, T.**, Krüger, J., Schmidt, H., und Dunemann, F. (1995): Identification of PCR-based markers linked to the powdery-mildew-resistance gene *PI1* from *Malus robusta* in cultivated apple. Plant Breeding 114: 530-534.
- Martinez, J. L.** und Baquero, F. (2000): Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44: 1771-1777.
- McDermott, J. M.**, Brändle, U. E., Dutley, U. A., Haemmerli, U. A., Keller, S., Müller, K. E., und Wolfe, M. S. (1994): Genetic variation in powdery mildew of barley: Development of RAPD, SCAR, VNTR markers. Phytopathology 84: 1316-1321.
- McDonald, B. A.** und Linde, C. (2002): The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. Euphytica 124: 163-180.
- McDowell, J. M.** und Woffenden, B. J. (2003): Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. Trends in Biotechnology 21: 178-183.
- McGrath, M. T.** (2001): Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: experinces and challenges. Plant Disease 85: 236-245.
- Mervin, I. A.**, Brown, S. K., Rosenberger, D. A., Cooley, D. R., und Berkett, L. P. (1994): Scab-resistant apples for the northeastern United States: new prospects and old problems. Plant Disease 78: 4-10.
- Miazzi, M.**, Hajjeh, H., und Faretra, F. (2008): Occurrence and distribution of two distinct genetic groups in populations of *Erysiphe necator* Schw. in southern Italy. Journal of Plant Pathology 90: 563-573.
- Mihatsch, H.** und Mildenberger, G. (1967): Beiträge zur Vererbung der Mehlttauresistenz bei *Malus* III.: Beobachtungen zu Frühselektionsproblemen. Der Züchter 37: 25-32.
- Miller, T. C.** und Gubler, W. D. (2004): Sensitivity of california isolates of *Uncinula necator* to trifloxystrobin and sproxamine, and update on triadimefon sensitivity. Plant Disease 88: 1205-1212.
- Montarry, J.**, Cartolaro, P., Delmotte, F., Jolivet, J., und Willocquet, L. (2008): Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during grapevine powdery mildew epidemics. Applied and Environmental Microbiology 74: 6327-6332.
- Montarry, J.**, Cartolaro, P., Richard-Cervera, S., und Delmotte, F. (2009): Spatio-temporal distribution of *Erysiphe necator* genetic groups and tehir relationship with disease levels in vineyard. European Journal of Plant Pathology 123: 61-70.

- Morzfeld, J.**, Koopmann, B., und Hoppe, H. H. (2004): Development of fungicide resistance of wheat and barley pathogens against strobilurins: A methodological approach. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 111: 105-114.
- Mundt, C. C.** (1990): Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids. *Phytopathology* 80: 221-223.
- Ognjanov, V.** und Vujanic-Varga, D. (1988): Evaluation of *Malus* germplasm for resistance to powdery mildew and scab. *Acta Horticulturae* 224: 157-163.
- Olmstead, J. W.** und Lang, G. A. (2000): A leaf disc assay for screening sweet cherry genotypes for susceptibility to powdery mildew. *HortScience* 35: 274-277.
- Parisi, L.**, Fouillet, V., Schouten, H. J., Groenwold, R., Laurens, F., Didelot, F., Evans, K. M., Fischer, C., Gennari, F., Kemp, H., Lateur, M., Patocchi, A., Thissen, J., und Tsipouridis, C. (2004): Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. *Acta Horticulturae* 663: 107-113.
- Parisi, L.**, Lespinasse, Y., Guillaumes, J., und Krüger, J. (1993): A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. *Phytopathology* 83: 533-537.
- Pasche, J. S.**, Piche, L. M., und Gudmestad, N. C. (2005): Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration. *Plant Disease* 89: 269-278.
- Pedersen, W. L.** und Leath, S. (1988): Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. *Annual Review of Phytopathology* 26: 369-378.
- Péros, J.-P.**, Troulet, C., Guerriero, M., Michel-Romiti, C., und Notteghem, J.-L. (2005): Genetic variation and population structure of the grape powdery mildew fungus, *Erysiphe necator*, in southern France. *European Journal of Plant Pathology* 113: 407-416.
- Reimann, S.** und Deising, H. B. (2005): Inhibition of efflux transporter-mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-Hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3269-3275.
- Reuveni, M.** (2000): Efficacy of trofloxystrobin (Flint), a new strobilurin fungicide, in controlling powdery mildews on apple, mango and nectarine, and rust on prune trees. *Crop Protection* 19: 335-341.
- Robinson, H. L.**, Ridout, C. J., Sierotzki, H., Gisi, U., und Brown, J. K. M. (2002): Isogamous, hermaphroditic inheritance of mitochondrien-encoded resistance to Qo-inhibitor fungicides in *Blumeria graminis* f.sp. *tritici*. *Fungal Genetics and Biology* 36: 98-106.
- Rosenberg, S. M.** (2001): Evolving responsively: adaptive mutation. *Nature Reviews* 2: 504-515.
- Roßberg, D.** (2003): NEPTUN 2001 - Erhebung von Daten zum tatsächlichen Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel im Obstbau, im Hopfen und in Erdbeeren. *Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft* 122.
- Schander, H.** (2005): Untersuchungen zur Entwicklung von Frühselektionsmethoden für die Apfelzüchtung. *Der Züchter* 28: 105-132.

- Schulze, K.** (2005): Entwicklung eines neuartigen *In vitro*-Testsystems zur Überprüfung der Wirkungen von Fungiziden auf Konidienkeimung sowie Bildung von Appressorien und Penetrationshyphen bei *Venturia inaequalis*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Schuster, M.** (2000): Genetics of powdery mildew resistance in *Malus* species. *Acta Horticulturae* 538: 593-595.
- Schwarz, G.**, Bäumler, S., Block, A., Felsenstein, F. G., und Wenzel, G. (2004): Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estimation in DNA pools using real time PCR. *Nucleic Acids Research* 32: e24.
- Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft** (2002): Kontrollierte, integrierte Obstproduktion 2001. Auswertungen, Pflanzenschutz, Fruchtausdünnung, Stickstoffdüngung. Report.
- Seglias, N. P.** und Gessler, C. (1997): Genetics of apple powdery mildew resistance from *Malus zumi* (PI2). *WPRS Bulletin* 20: 195-208.
- Seko, Y.**, Bolay, A., Kiss, L., Heluta, V., Grigaliunaite, B., und Takamatsu, S. (2008): Molecular evidence in support of recent migration of a powdery mildew fungus on *Syringa* spp. into Europe from East Asia. *Plant Pathology* 57: 243-250.
- Shan, X.**, Blake, T. K., und Talbert, L. E. (1999): Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1072-1078.
- Sierotzki, H.**, Frey, R., Wullschleger, J., Palermo, S., Karlin, S., Godwin, J., und Gisi, U. (2007): Cytochrome *b* gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for Qol resistance. *Pest Management Science* 63: 225-233.
- Sierotzki, H.**, Wullschleger, J., und Gisi, U. (2005): Point mutation in cytochrome *b* gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 68: 107-112.
- Smith, I. M.**, Duneth, J., Elliott, R. A., Phillips, D. H., und Archer, S. A. (1988): European handbook of plant diseases. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Großbritannien.
- Smith, M. L.**, Duchesne, L. C., Bruhn, J. N., und Anderson, J. B. (1990): Mitochondrial genetics in a natural population of the plant pathogen *Armillaria*. *Genetics* 126: 575-582.
- Spotts, R. A.** (1984): Infection of Anjou pear fruit by *Podosphaera leucotricha*. *Plant Disease* 68: 857-859.
- Spotts, R. A.**, Covey, R. P., und Chen, P. M. (1981): Effect of low temperature on survival of apple buds infected with the powdery mildew fungus. *HortScience* 16: 781-783.
- Squirrell, J.**, Hollingsworth, P. M., Woodhead, M., Russell, J., Lowe, A. J., Gibby, M., und Powell, W. (2003): How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology* 12: 1339-1348.
- Stalder, L.** (1954): Beobachtungen über das Verhalten von *Podosphaera leucotricha* (Ellis et Everh.) Salm. in Apfelknospen. Kurze Mitteilungen aus der Eidgenössischen Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil, Schweiz.

- Stankiewicz, M.** und Pitera, E. (2002): The use of molecular markers in apple breeding for disease resistance. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 445-448.
- Stankiewicz, M.**, Pitera, E., und Gawronski, S. W. (2001): Genetic Analysis of a polish apple selection U211 as a new source of high resistance to apple powdery mildew. *Acta Horticulturae* 546: 641-644.
- Stankiewicz-Kosyl, M.** und Pitera, E. (2005): Mapping QTL involved in powdery mildew resistance of the apple clone U211. *Plant Breeding* 124: 63-65.
- Staub, T.** (1991): Fungicide Resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annual Review of Phytopathology* 29: 421-442.
- Steinfeld, U.**, Sierotzki, H., Parisi, S., Poirey, S., und Gisi, U. (2001): Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. *Pest Management Science* 57: 787-796.
- Stummer, B. E.**, Zanker, T., Scott, E. S., und Whisson, D. L. (2000): Genetic diversity in populations of *Uncinula necator*: comparison of RFLP- and PCR-based approaches. *Mycological Research* 104: 44-52.
- Taylor, D. R.**, Zeyl, C., und Cooke, E. (2002): Conflicting levels of selection in the accumulation of mitochondrial defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academie of Sciences USA* 99: 3690-3694.
- Thiermann, M.**, Fischer, C., Durel, C. E., und Calenge, F. (2002): QTL-Analyse von polygen vererbten Schorf- und Mehltairesistenzen beim Apfel. In: Gesellschaft für Pflanzenzüchtung, Vom Genom zur Sorte, Vorträge für Pflanzenzüchtung. Tagungsband 54, GPZ-Tagung 27.2.-1.3.2002, Hohenheim.
- Thines, E.**, Aguirre, J., Foster, A. J., und Deising, H. B. (2006): Secondary metabolites as virulence determinants of fungal plant pathogens. *Progress in Botany* 67: 137-159.
- Tsuyama, H.**, Nagai, M., und Aizawa, T. (1967): Germination of ascospore of apple powdery mildew. *Journal of the Faculty of Agriculture, Iwate University* 8: 235-243.
- Urbanietz, A.** (2002): Genetische und molekulare Charakterisierung der Resistenz des Apfels gegen den Echten Mehltau und der Virulenz des Erregers *Podopshaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm.. Dissertation, Universität Hannover.
- Urbanietz, A.** und Dunemann, F.,(2005): Isolation, identification and molecular characterization of physiological races of apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*). *Plant Pathology* 54: 125-133.
- Vera Cruz, C. M.**, Bai, J., Oña, I., Leung, H., Nelson, R., Mew, T. W., und Leach, J. E. (2000): Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proceedings of the National Academie of Sciences USA* 97: 13500-13505.
- Visser, T.** und Verhaegh, J. J. (1976): Review of tree fruit breeding carried out at the Institute for Horticultural Plant Breeding at Wageningen from 1951-1976. *Proceedings of the Eucarpia meeting of fruit tree breeding Wageningen, Niederlande*, 113-132.
- Vos, P.**, Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemann, J., Kuiper, M., und Zabeau, M. (1995): AFLP: A new techniques for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

- Whisson, D. L.** (1996): Molecular characterisation and pathogenicity of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* in Australia. *Australasian Plant Pathology* 25: 55-63.
- Williams, R. H.** und Fitt, B. D. L. (1999): Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans*, causal agent of stem canker (Blackleg) of oilseed rape. *Plant Pathology* 48: 161-175.
- Woo, K. S.** und Newcombe, G. (2003): Absence of residual effects of a defeated resistance gene in poplar. *Forest Pathology* 33: 81-89.
- Wood, P. M.** und Hollomon, D. W. (2003): A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the QoI site of complex III. *Pest Management Science* 59: 499-511.
- Xu, J.** (2005): The inheritance of organelle genes and genomes: patterns and mechanisms. *Genome* 48: 951-958.
- Xu, X.-M.** und Butt, D. J. (1998): Effects of temperature and atmospheric moisture on the early growth of apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) colonies. *European Journal of Plant Pathology* 104: 133-140.
- Zane, L.,** Bargelloni, L., und Patarnello, T. (2002): Strategies for microstallite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zheng, D.,** Olaya, G., und Köller, W. (2000): Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. *Current Genetics* 38: 148-155.
- Ziegler, H.,** Benet-Buchholz, J., Etzel, W., und Gayer, H. (2003): Trifloxystrobin- a new strobilurin fungicide with an outstanding biological activity. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 56: 213-230.

## **9 Anhang**

### **9.1 Abbildungsverzeichnis**

**Abbildung 1:** Stammbaum der *Malus*-Genotypen aus der Population 98/6, mit pyramidierten Resistenzen *PI1* und *PI2*

**Abbildung 2:** Reaktion der *Malus*-Genotypen: Mittelwerte für i%, s% und a%

**Abbildung 3:** RAPD-Primer-Kombination LTR3 & RAPD499

**Abbildung 4:** SSR-Primer PI329, PI153 und PI368 in Multiplex-Reaktion

**Abbildung 5a:** AFLP-Marker für ausgewählte Isolate und ihre Entsprechung im C3-SCAR-Marker

**Abbildung 5b:** D5-SCAR-Marker für ausgewählte Isolate

**Abbildung 6:** Dendrogramm für 20 Mehltausolate basierend auf 63 Markern

**Abbildung 7:** Dendrogramm für 27 Mehltausolate basierend auf 17 Markern.

**Abbildung 8:** Sequenzvergleich der partiellen Aminosäuresequenzen des Cytochrom *b*-Genes verschiedener phytopathogener Pilze

**Abbildung 9:** CAPS-Analyse mit dem Enzym *Sat1* von einer Auswahl von Mehltausolaten und Kontroll-Plasmid-DNA

**Abbildung 10:** Sequenzvergleich 47 klonierter Cytochrom *b*-Fragmente der *P.I.*-Isolate Ahr-11, GB-43K2, F1-12 und In6c

**Abbildung 11:** Elektropherogramm des für die G143A-Mutation relevanten Ausschnittes der *Podosphaera leucotricha* Cytochrom *b*- Nukleotidsequenz

**Abbildung 12:** Wirkung des Strobilurin-Fungizides Trifloxystrobin auf die pathogene Entwicklung verschiedener Apfelmehltau-Isolate auf *in vitro* kultivierten Apfelblättern

**Abbildung 13:** Dosis-Wirkung-Beziehungen des Strobilurin-Fungizides Trifloxystrobin auf die Keimung von Konidien verschiedener Apfelmehltau-Isolate

**Abbildung 14:** Wachstum der Isolate GB-43K2 (a, c, e) und Ahr-11 (b, d, f) unter Einfluß von Strobilurin

## 9.2 Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Beschriebene Resistenzgene gegen Apfelmehltau in der Gattung *Malus*

**Tabelle 2:** *Malus*-Testsortiment für Pathogenitätstests

**Tabelle 3a:** Herkunft der reinen Einsporisolate von *Podosphaera leucotricha*: Isolate mit unbekannter Fungizidgeschichte

**Tabelle 3b:** Herkunft der reinen Einsporisolate von *Podosphaera leucotricha*: Isolate mit bekannter Fungizidgeschichte

**Tabelle 4:** Für die Anreicherung verwendete Oligonukleotide

**Tabelle 5a:** Ergebnisse der Blatttestungen von 12 Isolaten auf 41 Genotypen: durchschnittlich befallene Blattfläche (a%); Genotypen mit definierter Resistenz

**Tabelle 5b:** Ergebnisse der Blatttestungen von 12 Isolaten auf 41 Genotypen: durchschnittlich befallene Blattfläche (a%); *Malus*-Wildarten und Sorten ohne definierte Resistenz

**Tabelle 6:** Pathogenität der Apfelmehltau-Isolate in Prozent infizierter Genotypen und Virulenz in durchschnittlich befallener Blattfläche a%

**Tabelle 7:** Reaktion der *Malus*-Genotypen mit definierter Resistenz auf Mehltausolate

**Tabelle 8:** Ergebnisse der Anreicherung von Mikrosatellitenmotiven in einer partiellen genomischen Bank des Apfelmehltau

**Tabelle 9:** Mikrosatellitensequenzen: Motive in der partiellen genomischen Bank

**Tabelle 10:** Entwickelte Mikrosatelliten-Primer

**Tabelle 11:** Anteil polymorpher AFLP-Marker an auswertbaren Banden

**Tabelle 12:** Entwickelte AFLP-SCAR-Marker

**Tabelle 13:** Gruppeneinteilung von *P. leucotricha*-Isolaten und Feldproben basierend auf 3 Dendrogrammen

## 9.3 Verzeichnis der Tabellen im Anhang

**Tabelle A1:** Mehltau-Feldproben aus fünf Ländern

**Tabelle A2:** Verwendete Oligonukleotide

**Tabelle A3:** Ergebnisse der Blatttestungen von 12 Isolaten auf 41 Genotypen

**Tabelle A4:** Anzahl der getesteten Blätter (n), Anzahl und prozentualer Anteil der infizierten Blätter (i und i%)

**Tabelle A5:** Durchschnittlich befallene Blattfläche der infizierten Blätter (s%) und berechnete Standardabweichung (SD)

**Tabelle A6:** Durchschnittlich befallene Blattfläche aller getesteten Blätter (a%) und berechnete Standardabweichung (SD)

**Tabelle A7:** Verzeichnis der evaluierten AFLP-Marker

## 9.4 Tabellen im Anhang

Tabelle A1: Mehltau-Feldproben aus fünf Ländern

Jahr	Ort	Mehltau		Sorte	Probennr.	Material	
		prim.	sek.			Blatt	Rinde
<b>China</b>							
2004	Xingping county	x		?	ChI-1-1 bis ChI-1-3	x	
	Xingping county	x		Floracrown	ChI-2-1 bis ChI-2-3	x	
	Xingping county	x		Fuji	ChI-3-1 bis ChI-3-3	x	
	Xingping county	x		Qinguan	ChI-4-1 bis ChI-4-3	x	
	Yangling, Shaanxi	x		Guo-guang	ChI-5-1 bis ChI-5-3	x	
	Yangling, Shaanxi	x		Guo-guang	ChI-6-1 bis ChI-6-3	x	
	Yangling, Shaanxi	x		Guo-guang	ChI-7-1 bis ChI-7-3	x	
	Yangling, Shaanxi	x		Guo-guang	ChI-8-1 bis ChI-8-3	x	
	Yangling, Shaanxi	x		Guo-guang	ChI-9-1 bis ChI-9-3	x	
	Xingping county	x		Gala	ChI-10-1 bis ChI-10-3	x	
2003	Lai-yang	x		Hong-Yu	ChII-1		x
	Lai-yang	x		Guo-guang	ChII-2		x
	Lai-yang	x		Qiu-hua-pi	ChII-3		x
	Lai-yang	x		Guo-guang	ChII-4		x
	Lai-yang	x		Fuji	ChII-5		x
	Lai-yang	x		Guo-guang	ChII-6		x
	Lai-yang	x		Qiu-hua-pi	ChII-7	x	
	Lai-yang	x		Jonagold	ChII-8	x	
	Lai-yang	x		Fuji	ChII-9	x	
	Wei-hai	x		Guo-guang	ChII-10	x	
	Lai-yang	x		Hong-yu	ChII-35-1		x
	Lai-yang	x		Hong-yu	ChII-36-1 bis ChII-36-2		x
	Lai-yang		x	Guo-guang	ChII-37-1 bis ChII-37-3	x	
	Lai-yang		x	Guo-guang	ChII-38-1 bis ChII-38-3	x	
	Lai-yang		x	Fuji	ChII-39-1 bis ChII-39-3	x	
	Lai-yang	x		Qiu-hua-pi	ChII-40		x
	Lai-yang	x		Jonagold	ChII-41		x
	Lai-yang	x		Fuji	ChII-42		x
	Lai-yang		x	Guo-guang	ChII-43-1 bis ChII-43-3	x	
	Lai-yang		x	?	ChII-44-1 bis ChII-44-3	x	
	Lai-yang		x	rootstock	ChII-45-1 bis ChII-45-3	x	
2004	Lai-yang		x	Guo-guang	ChII-46-1 bis ChII-46-5	x	
	Lai-yang		x	Guo-guang	ChII-47-1 bis ChII-47-5	x	
	Lai-yang		x	Jonagold	ChII-48-1 bis ChII-48-5	x	
	Lai-yang		x	Jonagold	ChII-49-1 bis ChII-49-5	x	
<b>Deutschland</b>							
2003	Borthen bei DD	x	x	Idared	D1-1 bis D1-5	x	
	Borthen bei DD	x	x	Jonagold	D2-1 bis D2-5	x	
	Borthen bei DD	x	x	Pinova	D3-1 bis D3-5	x	
	Pirna bei DD	x	x	Idared	D4-1 bis D4-5	x	
	Pirna bei DD	x	x	Jonagold	D5-1 bis D5-5	x	
	Pirna bei DD	x	x	Pinova	D6-1 bis D6-5	x	
2004	Borthen bei DD	x	x	Idared	D7-1 bis D7-5	x	
	Borthen bei DD	x	x	Jonagold	D8-1 bis D8-5	x	
	Borthen bei DD	x	x	Pinova	D9-1 bis D9-5	x	
	Pirna bei DD	x	x	Pinova	D10-1 bis D10-5	x	
<b>Großbritannien</b>							
2003	East Malling	x		Gala	GB1-1 bis GB1-3	x	
	East Malling	x		Cox	GB2-1 bis GB2-3	x	
	East Malling	x		Gala	GB3-1 bis GB3-3	x	
	East Malling	x		Cox	GB4-1 bis GB4-3	x	
2004	East Malling	x		Gala	GB5-1 bis GB5-3	x	
	East Malling	x		Cox	GB6-1 bis GB6-3	x	
	East Malling	x		Gala	GB7-1 bis GB7-3	x	
	East Malling	x		Cox	GB8-1 bis GB8-3	x	

Fortsetzung **Tabelle A1: Mehltau-Feldproben aus fünf Ländern**

Jahr	Ort	Mehltau		Sorte	Probennr.	Material	
		prim.	sek.			Blatt	Rinde
<b>Ungarn</b>							
2003	Gödöllő	x		Idared	U1-1 bis U1-3	x	
	Pecs	x	x	Jonathan	U2-1 bis U2-3	x	
	Szabadka		x	Idared	U3-1 bis U3-3	x	
	Törökbalint		x	Jonathan	U4-1 bis U4-3	x	
<b>Indien</b>							
2004	Bajaura, Kullu	x		<i>M. baccata</i>	In1	x	
2004	Bajaura, Kullu	x		<i>M. baccata</i>	In2-1 bis In2-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Sämling	In3-1 bis In3-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Starking Delicious	In4	x	
	Bajaura, Kullu	x		Jonathan	In5-1 bis In5-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Granny Smith	In6-1 bis In6-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		<i>M. baccata</i>	In7-1 bis In7-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		<i>M. baccata</i>	In8-1 bis In8-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Red June	In9-1 bis In9-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Winter commercial	In10-1 bis In10-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Golden Delicious	In11-1 bis In11-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Golden Delicious	In12-1 bis In12-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		<i>M. baccata</i>	In13-1	x	
	Bajaura, Kullu	x		Starking Delicious	In14-1 bis In14-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Golden Delicious	In15-1 bis In15-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Red Gold	In16-1 bis In16-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		<i>M. baccata</i>	In17-1 bis In17-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Jonathan	In19-1 bis In19-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		<i>M. baccata</i>	In20-1 bis In20-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Golden Delicious	In21-1 bis In21-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Golden Delicious	In22-1 bis In22-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Royal Gala	In23-1 bis In23-3	x	
	Bajaura, Kullu	x		Tydemans` Early	In25-1 bis In25-3	x	

**Tabelle A2: Verwendete Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz	T <sub>A</sub> [°C]	Markierung
<b>Sequenzierungsprimer</b>			
M 13 for. (-29)	5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3'	55,0	IRD 700
M 13 rev. (-29)	5'-GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG-3'	55,0	IRD 800
<b>Mikrosatelliten-Marker/ Entwicklung</b>			
SSR-Adapter oben	5'-CT CTT GCT TAC GCG TGG ACT A-3'	56,0	
SSR-Adapter unten	3'-ACA CGA GAA CGA ATG CGC ACC TGA T-p*-5'		
PI 153-forward	5'-GGA AAG ACG TAG AGA CGA GGA-3'	59,8	IRD 700
PI 153-reverse	5'-AAC CCC TCT CTT CGT GGA CT-3'	59,8	
PI 273-forward	5'-CCC GTT CAA AGC ATT TCC CTA-3'	59,8	IRD 800
PI 273-reverse	5'-TCA AAG AAG CAT TTC CAG TAG TTG-3'	59,8	
PI 329-forward	5'-TCA TCG TGT TCT GGA TCG AA-3'	56,0	IRD 700
PI 329-reverse	5'-AAT CAG CAC TGC TTT CCT TCA-3'	56,0	
PI 368-forward	5'-TCT CGA GTG CCG ATT CCA TC-3'	56,0	IRD 800
PI 368-reverse	5'-AAT CCA ATC GGT TTC GGT AG-3'	56,0	
PI 393-forward	5'-GCG AGA ACG AAT TAG GGA TG-3'	64,0	IRD 800
PI 393-reverse	5'-GAA ATA CGC TTG TCC CGT TTG-3'	64,0	
<b>AFLP-Marker</b>			
Eco-Adapter oben	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'		
Eco-Adapter unten	5'-AAT TGG TAC GCA GTC-3'		
Mse-Adapter oben	5'-GAC GAT GAG TTC TGA G-3'		
Mse-Adapter unten	5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'		
Eco+0	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'	66,0	
Mse+0	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'	66,0	
Eco+AA	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA-3'	66,0	IRD 700
Eco+AC	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC-3'	66,0	IRD 700
Mse+AA	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAA-3'	66,0	
Mse+AC	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AAC-3'	66,0	
Mse+CA	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA-3'	66,0	
Mse+CC	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACC-3'	66,0	
<b>SCAR-Marker</b>			
C3-forward	5'-GAA TTC ACC AAC GAC CTT GAG CTC GG-3'	66,0	
C3-reverse	5'-TTA ACC GCA GCC ATG GCC CCG TG-3'	66,0	
D5-forward	5'-GAA TTC ACC GGC GCT GGA CAT CGC G-3'	66,0	
D5-reverse	5'-TTA ACA TAC GGG AAC GAT CAC TTC CAC C-3'	66,0	
<b>Mehltauspezifische Primer</b>			
PM33-1-for	5'-TAT GGC AAT CCA CAT TCA AG-3'	52,0	
PM33-1-rev	5'-GAC AGG AAT TTT TCC CAC AG-3'	52,0	
<b>RAPD-Marker</b>			
LTR3	5'-GCA ATT GTA ACG GGC TGA AC-3'	55,0	
RAPD499	5'-CAG GCC CTT CTG CAG AGC TG-3'	55,0	
<b>Cytochrom b</b>			
RSCBF1	5'-TAT TAT GAG AGA TGT AAA TAA TGG-3'	55,0	
RSCBR2	5'-AAC AAT ATC TTG TCC AAT TCA TGG-3'	55,0	
PM-COB-for	5'-ACA GCT TCA GCT TTC TTC TTT TTA G-3'	58,0	
PM-COB-rev	5'-ATT CAT GGT ATT GCA CTC ATA AGG T-3'	58,0	
PM-SNP-for	5'-CGT TAC TTA CAC TCA AAT ACA GCT TCA-3'	68,5	
PM-SNP-C-rev	5'-ACT CAT AAG GTT AGT AAT AAC TGT TGC AG-3'	68,5	
PM-SNP-G-rev	5'-ACT CAT AAG GTT AGT AAT AAC TGT TGC AC-3'	68,5	

\* phosphoryliert

**Tabelle A3: Zusammenfassende Ergebnisse der Blattstungen von 12 Isolaten auf 41 Genotypen**

Isolat	Ch9-1-11			F1-12			InA2-15			ChIII-8			Chi-5			InA2-20			InA3-11			InA3-21			Ahr11			In4f			In6a			In6c			Alle Isolate		
	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%
A 142/5	35	63	55	25	44	57	48	48	100	41	55	75	16	28	57	15	15	100	30	30	100	59	76	78	60	60	100	31	39	80	3	20	17				34	48	71
98/6-21	32	53	60	3	8	40	67	100	67	8	9	83	4	10	43	36	36	100	18	28	67	14	29	50				3	10	33	0	0	0				16	28	57
98/6-29	9	11	80	3	5	50	9	23	40	1	5	20	15	30	50	3	5	50				18	18	100	3	5	50	3	10	33	0	0	0				6	13	47
<i>M. robusta persicifolia</i>	43	43	100	35	35	100	0	0	0	95	95	100	15	15	100	60	60	100							0	0	0	8	8	100				0	0	0	29	47	62
98/6-1	5	9	57	4	7	60	0	0	0	0	0	0	1	5	25	0	0	0	2	5	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	14
98/6-11	2	8	23	4	7	60	0	0	0	0	0	0	1	5	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	8
98/6-9	5	8	55	1	5	20	29	33	86	3	8	44	1	5	20	16	33	50	9	12	75	39	62	63	20	20	100	10	20	50	2	10	20				12	23	54
<i>M. zumi</i> 274	31	31	100	19	19	100	60	60	100	67	73	92	18	23	80	65	65	100	18	35	50	34	59	57				56	78	73	22	43	50				41	52	78
98/6-10	1	10	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	1
98/6-2	0	0	0	0	0	0	23	70	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	70	3			
98/6-4	4	9	40	4	8	50	9	22	43	0	5	9	1	5	20	13	25	50	13	33	40	0	0	0	37	37	100	3	18	18	7	20	33				5	19	29
98/6-5	0	5	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1
D12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	8	0	0	0	0	5	1
MIS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	1
E 295-4 (White Angel)	0	0	0	0	0	0				0	0	0	0	0	0													0	0	0							0	0	0

dunkelblau: keine Infektion, a%=0

mittelblau: Infektion, aber immer noch als resistente Reaktion betrachtet, a%<10

gelb: Infektion, a%>10

Fortsetzung Tabelle A3: Zusammenfassende Ergebnisse der Blattstungen von 12 Isolaten auf 41 Genotypen

Isolat	Ch9-1-11			F1-12			InA2-15			ChIII-8			ChI-5			InA2-20			InA3-11			InA3-21			Ahr11			In4f			In6a			In6c			Alle Isolate			
	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	a%	s%	i%	
Alkmene	73	73	100	90	90	100	19	35	55	0	0	0	50	60	83	0	0	0	5	20	25	3	15	23	33	58	57	0	0	0	0	0	0	0	0	19	53	35		
Carola	33	100	33	17	50	33	77	77	100	59	59	100				17	50	33	24	60	40	3	8	40	90	90	100	27	60	44	0	0	0				31	60	51	
Danziger Kant	53	70	75	0	0	0	32	32	100	38	50	75	0	0	0	10	60	17	80	80	100	2	5	33	10	10	100	22	22	100	5	10	50				25	43	58	
Delicious	33	60	56	85	85	100	43	60	71	90	90	100	39	90	43	50	50	100	53	59	91	43	55	79	68	68	100	55	87	64	49	53	92	10	20	50	49	63	77	
Democrat	50	100	50	20	20	100	100	100	100	31	42	75	0	0	0				39	39	100	42	84	50	50	50	100	24	43	57							41	66	63	
Discovery	1	10	14	0	0	0	10	10	100	0	0	0	1	5	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0				0	0	0	14	21	64	1	5	25	4	16	22	
Dülmener Rosenapfel	5	15	33	4	8	50	2	15	14	0	0	0	2	5	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	100	0	0	0	0	0	0				2	10	16	
E 334-62 (M. hupehensis)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	20	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	1	
Gibb's Golden Gage	19	31	60	53	93	57	63	90	70	55	69	80	1	5	17	92	92	100	42	42	100	41	66	62	57	100	57	55	90	62	30	52	58	6	10	60	47	70	67	
Laxton's Superb	23	53	43	40	40	100	49	74	67	25	25	100	26	35	75	49	65	75	50	67	75	15	40	38	33	58	57	12	28	43	13	36	38	0	0	0	25	49	50	
M. baccata mandshurica	8	11	67	3	10	33	58	58	100	0	0	0	35	47	75	7	80	8	0	0	0	0	0	0				0	0	0	0	0	0				10	35	28	
M. hupehensis 341	2	13	18	5	20	25	16	32	50	5	15	33	0	0	0	7	40	17	1	10	14	11	33	33	0	0	0	4	15	29	0	0	0	0	0	0	5	24	19	
M. sieboldii 722	3	10	33	6	8	75	0	0	0	1	5	17	10	10	100	0	0	0	0	0	0				1	5	25	11	15	75	0	0	0				3	10	29	
M. sieversii i 3569	40	40	100	38	45	83	37	37	100	38	38	100	5	5	100	16	27	60				58	58	100				13	13	100	4	18	22	10	20	50	27	36	75	
M. sieversii 3600	3	5	60	37	55	67							3	5	60	15	15	100													12	30	40	4	8	50	10	18	57	
M. sieversii 4011	16	23	71	20	20	100				20	20	100	18	31	57	7	10	67	1	5	25	10	40	25				0	0	0	1	10	11	0	0	0	9	22	40	
M. sieversii 4031	13	20	67	43	43	100				23	23	100	15	15	100	10	10	100	33	33	100	10	10	100	100	100	100	0	0	0	5	8	67	11	13	86	21	26	83	
M. sieversii 4035	21	36	57	60	60	100	50	63	80	68	68	100	30	30	100				17	40	43	0	0	0	100	100	100	90	90	100	30	30	100				41	55	74	
M. sylvestris 218	48	59	82	20	40	50	63	63	100	23	23	100	11	16	67				26	26	100	7	19	36	72	72	100	8	25	33							29	41	69	
M. trilobata 428	0	0	0	2	10	17	0	0	0	4	18	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	15	5
Peasgood's Nonesuch	13	40	33	40	40	100	51	76	67	40	40	100	0	0	0				57	57	100	38	46	82	48	95	50	17	33	50	0	0	0	0	0	0	31	53	58	
Pi-AS-22/17	41	82	50	23	35	67	34	60	57	36	36	100	3	5	50	35	35	100	0	0	0	25	43	57	60	60	100	19	42	46							28	47	60	
Prima	58	58	100				3	15	20	0	0	0	6	11	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85	85	100	18	35	50	44	44	100	84	84	100	25	52	48	
Rewena	28	55	50				51	65	78				0	0	0	47	47	100	33	38	86	28	45	63	0	0	0	4	13	29	32	35	92	15	20	75	28	42	67	
Rote Sternrenette	33	100	33	5	5	100	83	83	100	5	6	80	0	0	0	21	31	67	40	53	77	25	63	40	40	40	100	22	26	83	15	30	50				26	40	65	
Tydeman's Late Orange	38	58	67	20	20	100	35	45	78	54	54	100	53	74	71	54	90	60	27	36	77	47	53	89	23	23	100	35	65	55	10	14	73	30	45	67	35	46	76	
Mittelwert über alle Genotypen	20	43	46	13	33	42	29	57	50	18	44	42	11	29	38	21	55	43	19	39	49	17	48	34	29	55	51	16	48	34	10	33	32	9	30	28	17	44	40	

Tabelle A4: Anzahl der getesteten Blätter (n), Anzahl und prozentualer Anteil der infizierten Blätter (i und i%)

Isolat Genotyp	InA2-15			InA2-20			InA3-11			InA3-21			Ahr-11			Ch9-1-11			ChI-5			ChIII-8			F1-12			In4f			In6a			In6c			Alle Isolate					
	n	i	i%	n	i	i%	n	i	i%	n	i	i%	n	i	i%	n	i	i%	n	i	i%	n	i	i%	n	i	i%	n	i	i%	n	i	i%	n	i	i%	n	i	i%	n	i	i%
A 142/5	7	7	100	2	2	100	8	8	100	9	7	78	2	2	100	11	6	55	7	4	57	8	6	75	7	4	57	5	4	80	6	1	17	0	0	na	72	51	71			
98/6-21	3	2	67	4	4	100	6	4	67	8	4	50	0	0	na	10	6	60	7	3	43	12	10	83	5	2	40	9	3	33	3	0	0	0	0	na	67	38	57			
98/6-29	5	2	40	2	1	50	0	0	na	2	2	100	2	1	50	5	4	80	2	1	50	5	1	20	2	1	50	3	1	33	2	0	0	0	0	na	30	14	47			
<i>M. robusta persicifolia</i>	3	0	0	6	6	100	0	0	na	0	0	na	3	0	0	2	2	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100	0	0	na	4	0	0	0	0	na	26	16	62
98/6-1	7	0	0	6	0	0	3	1	33	11	0	0	1	0	0	7	4	57	4	1	25	8	0	0	5	3	60	8	0	0	3	0	0	0	0	na	63	9	14			
98/6-11	6	0	0	4	0	0	5	0	0	10	0	0	4	0	0	13	3	23	7	1	14	10	0	0	5	3	60	6	0	0	10	0	0	5	0	0	0	0	na	85	7	8
98/6-9	7	6	86	4	2	50	8	6	75	8	5	63	3	3	100	11	6	55	5	1	20	9	4	44	5	1	20	6	3	50	5	1	20	0	0	0	0	na	71	38	54	
<i>M. zumi</i> 274	2	2	100	2	2	100	6	3	50	7	4	57	0	0	na	6	6	100	5	4	80	13	12	92	6	6	100	11	8	73	6	3	50	0	0	na	64	50	78			
98/6-10	7	0	0	3	0	0	6	0	0	16	0	0	3	0	0	9	1	11	3	0	0	12	0	0	7	0	0	8	0	0	6	0	0	0	0	na	80	1	1			
98/6-2	6	2	33	4	0	0	5	0	0	5	0	0	1	0	0	8	0	0	6	0	0	10	0	0	5	0	0	6	0	0	5	0	0	0	0	na	61	2	3			
98/6-4	7	3	43	2	1	50	5	2	40	11	0	0	3	3	100	10	4	40	5	1	20	11	1	9	6	3	50	11	2	18	6	2	33	0	0	na	77	22	29			
98/6-5	7	0	0	5	0	0	8	0	0	10	0	0	3	0	0	11	1	9	6	0	0	7	0	0	6	0	0	2	0	0	9	0	0	0	0	na	74	1	1			
D12	9	0	0	4	0	0	10	0	0	16	0	0	4	0	0	12	0	0	7	0	0	15	0	0	11	0	0	10	0	0	13	1	8	4	0	0	115	1	1			
MIS	5	0	0	11	0	0	7	0	0	9	0	0	3	0	0	8	0	0	5	0	0	14	1	7	11	0	0	13	0	0	10	0	0	9	0	0	105	1	1			
E 295-4 (White Angel)	0	0	na	0	0	na	0	0	na	0	0	na	0	0	na	4	0	0	4	0	0	14	0	0	8	0	0	8	0	0	0	0	na	0	0	na	38	0	0			
Alkmene	11	6	55	12	0	0	4	1	25	13	3	23	7	4	57	9	9	100	6	5	83	4	0	0	1	1	100	8	0	0	4	0	0	4	0	0	83	29	35			
Carola	3	3	100	3	1	33	5	2	40	5	2	40	1	1	100	3	1	33	0	0	na	5	5	100	3	1	33	9	4	44	2	0	0	0	0	na	39	20	51			
Danziger Kant	3	3	100	6	1	17	2	2	100	3	1	33	1	1	100	4	3	75	1	0	0	4	3	75	2	0	0	3	3	100	2	1	50	0	0	na	31	18	58			
Delicious	7	5	71	4	4	100	11	10	91	14	11	79	7	7	100	9	5	56	7	3	43	6	6	100	2	2	100	11	7	64	13	12	92	6	3	50	97	75	77			
Democrat	4	4	100	0	0	na	4	4	100	10	5	50	1	1	100	6	3	50	3	0	0	4	3	75	1	1	100	7	4	57	0	0	na	0	0	na	40	25	63			
Discovery	1	1	100	4	0	0	3	0	0	6	0	0	0	0	na	7	1	14	6	1	17	3	0	0	3	0	0	3	0	0	11	7	64	4	1	25	51	11	22			
Dülmener Rosenapfel	7	1	14	3	0	0	3	0	0	9	0	0	2	2	100	6	2	33	3	1	33	8	0	0	6	3	50	5	0	0	3	0	0	0	0	na	55	9	16			
E 334-62 ( <i>M. hupehensis</i> )	5	0	0	3	0	0	3	0	0	6	0	0	4	0	0	7	0	0	5	0	0	9	1	11	5	0	0	10	0	0	9	0	0	6	0	0	0	0	na	72	1	1
Gibb's Golden Gage	10	7	70	14	14	100	6	6	100	13	8	62	7	4	57	10	6	60	6	1	17	10	8	80	7	4	57	13	8	62	12	7	58	5	3	60	113	76	67			
Laxton's Superb	6	4	67	8	6	75	4	3	75	13	5	38	7	4	57	7	3	43	4	3	75	2	2	100	1	1	100	7	3	43	16	6	38	5	0	0	80	40	50			
<i>M. baccata mandshurica</i>	2	2	100	12	1	8	1	0	0	3	0	0	0	0	na	6	4	67	4	3	75	2	0	0	3	1	33	4	0	0	2	0	0	0	0	na	39	11	28			
<i>M. hupehensis</i> 341	6	3	50	6	1	17	7	1	14	15	5	33	2	0	0	11	2	18	5	0	0	6	2	33	4	1	25	7	2	29	17	0	0	3	0	0	89	17	19			
<i>M. sieboldii</i> 722	3	0	0	3	0	0	5	0	0	0	0	na	4	1	25	3	1	33	3	3	100	6	1	17	4	3	75	4	3	75	6	0	0	0	0	na	41	12	29			
<i>M. sieversii</i> 3569	3	3	100	5	3	60	0	0	na	5	5	100	0	0	na	5	5	100	2	2	100	5	5	100	6	5	83	2	2	100	9	2	22	2	1	50	44	33	75			
<i>M. sieversii</i> 3600	0	0	na	1	1	100	0	0	na	0	0	na	0	0	na	5	3	60	5	3	60	0	0	na	3	2	67	0	0	na	5	2	40	4	2	50	23	13	57			
<i>M. sieversii</i> 4011	0	0	na	3	2	67	4	1	25	4	1	25	0	0	na	7	5	71	7	4	57	2	2	100	1	1	100	2	0	0	9	1	11	3	0	0	42	17	40			
<i>M. sieversii</i> 4031	0	0	na	2	2	100	2	2	100	2	2	100	2	2	100	3	2	67	3	3	100	4	4	100	4	4	100	3	0	0	3	2	67	7	6	86	35	29	83			
<i>M. sieversii</i> 4035	5	4	80	0	0	na	7	3	43	3	0	0	1	1	100	7	4	57	4	4	100	6	6	100	2	2	100	4	4	100	4	4	100	0	0	na	43	32	74			
<i>M. sylvestris</i> 218	7	7	100	0	0	na	7	7	100	14	5	36	3	3	100	11	9	82	6	4	67	3	3	100	2	1	50	6	2	33	0	0	na	0	0	na	59	41	69			
<i>M. trilobata</i> 428	2	0	0	6	0	0	5	0	0	0	0	na	4	0	0	4	0	0	4	0	0	8	2	25	6	1	17	2	0	0	12	0	0	5	0	0	58	3	5			
Peasgood's Nonesuch	6	4	67	0	0	na	3	3	100	11	9	82	4	2	50	3	1	33	2	0	0	2	2	100	2	2	100	6	3	50	3	0	0	3	0	0	45	26	58			
Pi-AS-22/17	7	4	57	2	2	100	2	0	0	14	8	57	3	3	100	10	5	50	4	2	50	7	7	100	3	2	67	13	6	46	0	0	na	0	0	na	65	39	60			
Prima	5	1	20	5	0	0	3	0	0	10	0	0	2	2	100	8	8	100	8	4	50	1	0	0	0	0	na	4	2	50	5	5	100	5	5	100	56	27	48			
Rewena	9	7	78	5	5	100	14	12	86	16	10	63	2	0	0	10	5	50	4	0	0	0	0	na	0	0	na	7	2	29	13	12	92	4	3	75	84	56	67			
Rote Sternrenette	3	3	100	6	4	67	13	10	77	5	2	40	2	2	100	3	1	33	3	0	0	5	4	80	2	2	100	6	5	83	12	6	50	0	0	na	60	39	65			
Tydemans Late Orange	9	7	78	5	3	60	13	10	77	9	8	89	8	8	100	9	6	67	7	5	71	6	6	100	1	1	100	11	6	55	11	8	73	3	2	67	92	70	76			

na: i% konnte nicht berechnet werden, da in dieser Genotyp/ Isolat-Kombination keine Blätter getestet wurden.

**Tabelle A5: Durchschnittlich befallene Blattfläche der infizierten Blätter (s%) und berechnete Standardabweichung(SD)**

Isolat Genotyp	InA2-15		InA2-20		InA3-11		InA3-21		Ahr-11		Ch9-1-11		ChI-5		ChIII-8		F1-12		In4f		In6a		In6c		Alle Isolate		
	s%	SD	s%	SD	s%	SD	s%	SD	s%	SD	s%	SD	s%	SD	s%	SD	s%	SD	s%	SD	s%	SD	s%	SD	s%	SD	
A 142/5	48	33	15	14	30	26	76	41	60	0	63	41	28	17	55	25	44	37	39	40	20	na	na	na	48	34	
98/6-21	100	0	36	36	28	17	29	25	na	na	53	38	10	0	9	6	8	4	10	9	na	na	na	na	28	31	
98/6-29	23	4	5	na	na	na	18	11	5	na	11	8	30	na	5	na	5	na	10	na	na	na	na	na	13	9	
<i>M. robusta persicifolia</i>	na	na	60	37	na	na	na	na	na	na	43	53	15	7	95	7	35	21	8	4	na	na	na	na	47	38	
98/6-1	na	na	na	na	5	na	na	na	na	na	9	5	5	na	na	na	7	3	na	na	na	na	na	na	7	4	
98/6-11	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	8	6	5	na	na	na	7	3	na	na	na	na	na	na	7	4	
98/6-9	33	36	33	39	12	4	62	22	20	10	8	3	5	na	8	3	5	na	20	10	10	na	na	na	23	25	
<i>M. zumi</i> 274	60	14	65	21	35	28	59	27	na	na	31	22	23	22	73	27	19	9	78	28	43	35	na	na	52	32	
98/6-10	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	10	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	10	na	
98/6-2	70	14	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	70	14	
98/6-4	22	3	25	na	33	25	na	na	37	46	9	5	5	na	5	na	8	3	18	18	20	14	na	na	19	20	
98/6-5	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	5	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	5	na	
D12	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	5	na	na	na	5	na	
MIS	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	10	na	na	na	na	na	na	na	na	na	10	na	
E 295-4 (White Angel)	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
Alkmene	35	26	na	na	20	na	15	10	58	28	73	40	60	35	na	na	90	na	na	na	na	na	na	na	53	36	
Carola	77	32	50	na	60	28	8	4	90	na	100	na	na	na	59	40	50	na	60	29	na	na	na	na	60	33	
Danziger Kant	32	26	60	na	80	28	5	na	10	na	70	36	na	na	50	26	na	na	22	25	10	na	na	na	43	33	
Delicious	60	46	50	46	59	31	55	36	68	29	60	24	90	0	90	20	85	7	87	17	53	35	20	10	63	33	
Democrat	100	0	na	na	39	33	84	25	50	na	100	0	na	na	42	33	20	na	43	30	na	na	na	na	66	35	
Discovery	10	na	na	na	na	na	na	na	na	na	10	na	5	na	na	na	na	na	na	na	21	18	5	na	16	16	
Dülmener Rosenapfel	15	na	na	na	na	na	na	na	8	4	15	0	5	na	na	na	8	3	na	na	na	na	na	na	10	4	
E 334-62 ( <i>M. hupehensis</i> )	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	20	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	20	na
Gibb's Golden Gage	90	26	92	8	42	35	66	29	100	0	31	22	5	na	69	39	93	10	90	17	52	38	10	0	70	35	
Laxton's Superb	74	34	65	12	67	12	40	35	58	33	53	45	35	13	25	7	40	na	28	28	36	35	na	na	49	30	
<i>M. baccata mandshurica</i>	58	60	80	na	na	na	na	na	na	na	11	8	47	12	na	na	10	na	na	na	na	na	na	na	35	32	
<i>M. hupehensis</i> 341	32	18	40	na	10	na	33	37	na	na	13	11	na	na	15	7	20	na	15	7	na	na	na	na	24	22	
<i>M. sieboldii</i> 722	na	na	na	na	na	na	na	na	5	na	10	na	10	9	5	na	8	3	15	13	na	na	na	na	10	8	
<i>M. sieversii</i> 3569	37	23	27	29	na	na	58	18	na	na	40	37	5	0	38	23	45	38	13	11	18	11	20	na	36	28	
<i>M. sieversii</i> 3600	na	na	15	na	na	na	na	na	na	na	5	0	5	0	na	na	55	7	na	na	30	28	8	4	18	21	
<i>M. sieversii</i> 4011	na	na	10	0	5	na	40	na	na	na	23	18	31	18	20	0	20	na	na	na	10	na	na	na	22	15	
<i>M. sieversii</i> 4031	na	na	10	0	33	39	10	0	100	0	20	0	15	13	23	13	43	33	na	na	8	4	13	10	26	28	
<i>M. sieversii</i> 4035	63	39	na	na	40	36	na	na	100	na	36	21	30	47	68	39	60	14	90	20	30	23	na	na	55	36	
<i>M. sylvestris</i> 218	63	19	na	na	26	28	19	18	72	41	59	41	16	11	23	15	40	na	25	21	na	na	na	na	41	33	
<i>M. trilobata</i> 428	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	18	18	10	na	na	na	na	na	na	na	na	15	13
Peasgood's Nonesuch	76	34	na	na	57	25	46	29	95	7	40	na	na	na	40	14	40	0	33	12	na	na	na	na	53	28	
Pi-AS-22/17	60	28	35	21	na	na	43	41	60	44	82	40	5	0	36	16	35	21	42	16	na	na	na	na	47	33	
Prima	15	na	na	na	na	na	na	na	85	7	58	41	11	6	na	na	na	na	35	35	44	18	84	30	52	37	
Rewena	65	36	47	32	38	27	45	41	na	na	55	44	na	na	na	na	na	na	13	11	35	30	20	17	42	34	
Rote Sternrenette	83	21	31	18	53	25	63	53	40	14	100	na	na	na	6	3	5	0	26	27	30	18	na	na	40	31	
Tydemans Late Orange	45	30	90	5	36	23	53	35	23	14	58	38	74	25	54	32	20	na	65	18	14	6	45	7	46	31	

**Tabelle A6: Durchschnittlich befallene Blattfläche aller getesteten Blätter (a%) und berechnete Standard-Abweichung (SD)**

Isolat Genotyp	A2-15		A2-20		A3-11		A3-21		B11		Ch9-1-11		ChI-5		ChIII-8		F1-12		In4f		In6a		In6c		Alle Isolate		
	a%	SD	a%	SD	a%	SD	a%	SD	a%	SD	a%	SD	a%	SD	a%	SD	a%	SD	a%	SD	a%	SD	a%	SD	a%	SD	
A 142/5	48	33	15	14	30	26	59	49	60	0	35	44	16	19	41	33	25	35	31	38	3	8	na	na	34	36	
98/6-21	67	58	36	36	18	19	14	22	na	na	32	39	4	5	8	7	3	4	3	7	0	0	na	na	16	27	
98/6-29	9	12	3	4	na	na	18	11	3	4	9	8	15	21	1	2	3	4	3	6	0	0	na	na	6	9	
<i>M. robusta persicifolia</i>	0	0	60	37	na	na	na	na	0	0	43	53	15	7	95	7	35	21	8	4	na	na	0	0	29	37	
98/6-1	0	0	0	0	2	3	0	0	0	na	5	6	1	3	0	0	4	4	0	0	0	0	na	na	1	3	
98/6-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	1	2	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	1	2	
98/6-9	29	35	16	29	9	6	39	36	20	10	5	5	1	2	3	4	1	2	10	13	2	4	na	na	12	21	
<i>M. zumi</i> 274	60	14	65	21	18	26	34	37	na	na	31	22	18	21	67	33	19	9	56	43	22	33	na	na	41	35	
98/6-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	na	0	1	
98/6-2	23	37	0	0	0	0	0	0	0	na	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	na	2	13	
98/6-4	9	12	13	18	13	22	0	0	37	46	4	5	1	2	0	2	4	5	3	9	7	12	na	na	5	13	
98/6-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	na	na	0	1	
D12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
MIS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
E 295-4 (White Angel)	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Alkmene	19	26	0	0	5	10	3	8	33	36	73	40	50	39	0	0	90	na	0	0	0	0	0	0	19	33	
Carola	77	32	17	29	24	36	3	4	90	na	33	58	na	na	59	40	17	29	27	36	0	0	na	na	31	38	
Danziger Kant	32	26	10	24	80	28	2	3	10	na	53	46	0	na	38	33	0	0	22	25	5	7	na	na	25	33	
Delicious	43	48	50	46	53	34	43	39	68	29	33	36	39	48	90	20	85	7	55	46	49	37	10	13	49	40	
Democrat	100	0	na	na	39	33	42	47	50	na	50	55	0	0	31	34	20	na	24	31			na	na	41	42	
Discovery	10	na	0	0	0	0	0	0	na	na	1	4	1	2	0	0	0	0	0	0	14	18	1	3	4	10	
Dülmener Rosenapfel	2	6	0	0	0	0	0	0	8	4	5	8	2	3	0	0	4	5	0	0	0	0	na	na	2	4	
E 334-62 ( <i>M. hupehensis</i> )	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
Gibb's Golden Gage	63	49	92	8	42	35	41	40	57	53	19	23	1	2	55	45	53	50	55	47	30	39	6	5	47	44	
Laxton's Superb	49	46	49	32	50	35	15	29	33	39	23	39	26	21	25	7	40	na	12	22	13	27	0	0	25	32	
<i>M. baccata mandshurica</i>	58	60	7	23	0	na	0	0	na	na	8	8	35	25	0	0	3	6	0	0	0	0	na	na	10	23	
<i>M. hupehensis</i> 341	16	21	7	16	1	4	11	25	0	0	2	6	0	0	5	8	5	10	4	8	0	0	0	0	5	14	
<i>M. sieboldii</i> 722	0	0	0	0	0	0	na	na	1	3	3	6	10	9	1	2	6	5	11	13	0	0	na	na	3	6	
<i>M. sieversii</i> 3569	37	23	16	25	na	na	58	18	na	na	40	37	5	0	38	23	38	38	13	11	4	9	10	14	27	29	
<i>M. sieversii</i> 3600	na	na	15	na	na	na	na	na	na	na	3	3	3	3	na	na	37	32	na	na	12	22	4	5	10	18	
<i>M. sieversii</i> 4011	na	na	7	6	1	3	10	20	na	na	16	18	18	21	20	0	20	na	0	0	1	3	0	0	9	14	
<i>M. sieversii</i> 4031	na	na	10	0	33	39	10	0	100	0	13	12	15	13	23	13	43	33	0	0	5	5	11	11	21	27	
<i>M. sieversii</i> 4035	50	44	na	na	17	30	0	0	100	na	21	25	30	47	68	39	60	14	90	20	30	23	na	na	41	39	
<i>M. sylvestris</i> 218	63	19	na	na	26	28	7	14	72	41	48	44	11	12	23	15	20	28	8	16	na	na	na	na	29	33	
<i>M. trilobata</i> 428	0	0	0	0	0	0	na	na	0	0	0	0	0	0	4	11	2	4	0	0	0	0	0	0	0	1	4
Peasgood's Nonesuch	51	48	na	na	57	25	38	32	48	55	13	23	0	0	40	14	40	0	17	20	0	0	0	0	31	34	
Pi-AS-22/17	34	38	35	21	0	0	25	37	60	44	41	51	3	3	36	16	23	25	19	24	na	na	na	na	28	34	
Prima	3	7	0	0	0	0	0	0	85	7	58	41	6	7	0	na	na	na	18	29	44	18	84	30	25	36	
Rewena	51	42	47	32	33	29	28	39	0	0	28	41	0	0	na	na	na	na	4	7	32	31	15	17	28	34	
Rote Sternrenette	83	21	21	21	40	32	25	43	40	14	33	58	0	0	5	4	5	0	22	26	15	20	na	na	26	31	
Tydemans Late Orange	35	33	54	49	27	26	47	37	23	14	38	42	53	42	54	32	20	na	35	36	10	8	30	26	35	33	

na: a% konnte nicht berechnet werden, da entweder kein Blatt infiziert war und/ oder für diese Genotyp/ Isolat-Kombination konnte die Standardabweichung SD nicht berechnet werden, da weniger als 2 Blätter in dieser spezifischen Genotyp/ Isolat-Kombination infiziert waren

**Tabelle A4: Verzeichnis der evaluierten AFLP-Marker**

Primer-kombination	Fragmentgröße in bp	Isolate																									
		Ahr-11	Ahr-D	GB43K2	FGDT4	G-GxP	I-Coop16	Pillin-1	In4f	In6a	In6b	In6c	InA2-14	InA2-15	InA2-20	InA2-26	InA2-27	InA3-11	InA3-21	InA3-23	Ch-9-1-11	Ch1-12	ChI-4	ChI-5	ChIII-10	ChVIII-5	ChIX-3
E-AA M-AA	330	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1							
	320	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1							
	298	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	295	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0							
	270	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0						
	150	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
E-AA M-AC	270	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	125	0	0	1	0	2	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	110	0	0	1	0	2	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-AA M-CA	300	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	295	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	250	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	202	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1
	200	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0							
	123	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0						
	100	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	80	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
	60	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0							
	45	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fortsetzung **Tabelle A3: Verzeichnis der evaluierten AFLP-Marker**

Primer-kombination	Fragmentgröße in bp	Isolate																										
		Ahr-11	Ahr-D	GB43K2	FGDT4	G-GxP	I-Coop16	Pilln-1	In4f	In6a	In6b	In6c	InA2-14	InA2-15	InA2-20	InA2-26	InA2-27	InA3-11	InA3-21	InA3-23	Ch-9-1-11	Ch1-12	Chl-4	Chl-5	ChIII-10	ChVIII-5	ChIX-3	Ch9-1-28
E-AA M-CC	348	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0							
	241	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1								
	220	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
	215	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
	212	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1								
	206	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	147	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	
	145	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1								
	130	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	
	125	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	
	108	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
E-AC M-AA	380	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0							
	375	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0							
	353	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0							
	349	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0							
	348	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0							
	340	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
	335	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0							
	330	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0							
	270	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
	268	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0							
	240	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0							
	220	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
	200	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0							
	195	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1								

Fortsetzung **Tabelle A3: Verzeichnis der evaluierten AFLP-Marker**

Primer-kombination	Fragmentgröße in bp	Ahr-11	Ahr-D	GB43K2	FGDT4	G-GXP	I-Coop16	Pilln-1	In4f	In6a	In6b	In6c	InA2-14	InA2-15	InA2-20	InA2-26	InA2-27	InA3-11	InA3-21	InA3-23	Ch-9-1-11	Ch1-12	ChI-4	ChI-5	ChIII-10	ChVIII-5	ChIX-3	Ch9-1-28	
E-AC M-AA	190	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1								
	180	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0								
	172	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0							
	160	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0							
	150	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0							
	148	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0							
	144	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0							
	135	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0							
	115	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0							
	107	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0							
	80	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0								
	75	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0								

## 9.5 Verwendete Chemikalien, Puffer und Kulturmedien

### 9.5.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bzw. Fisher Scientific (Schwerte) bezogen. Feinchemikalien stammten von Sigma (Taufkirchen bei München) oder Serva (Heidelberg). MS Fertignährmedium wurde von der Firma Duchefa (Haarlem, Niederlande), Bitek-Agar von Difco (Heidelberg) bezogen. Bezugsquellen für Enzyme, Kits oder spezielle Reagenzien sind an der entsprechenden Stelle im Text genannt.

Synthetische Oligonukleotide (Primer) wurden von den Firmen MWG-Biotech AG (Ebersberg) und Biomers (Ulm) bezogen.

### 9.5.2 Puffer und Lösungen

#### BAP-Stammlösung

0,2 g/l BAP in 1N NaOH

#### Bromphenolblau-Ladepuffer

0,25% Bromphenolblau  
40% Saccharose

#### 2X B&W-Puffer (Bind & Wash)

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
1 mM EDTA  
2 M NaCl

#### 2x CTAB-Puffer

2,0% (w/v) CTAB  
200 mM Tris pH 8,0  
20 mM DTA pH 8,0  
1,4M NaCl  
1,0% (w/v) PVP  
0,28 M  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### Diffusionspuffer

0,5 m NH<sub>4</sub>Ac  
10 mM MgAc  
1 mM EDTA (pH 8,0)  
0,1 % (w/v) SDS

#### Eluierungspuffer

100 mM EDTA  
1 % (w/v) SDS  
pH 8,0

#### Essigsäure Tinte

25% Essigsäure: Tinte 9:1 (v/v) (Königsblau 4001, Pelikan, Hannover)

#### IBA-Stammlösung

0,2 g/l IBA in 1N NaOH

KB-Plus Polyacrylamidgel 6,6% (25 cm)/ 5,5% (41 cm)

20 ml 6,5% KB-Plus Gelmatrix  
7,5% (v/v) APS  
0,75% (v/v) TEMED

Mikroskopierlösung

50% (v/v) Glycerol

TAE-Puffer 50 x

40 mM Trisacetat  
1 mM EDTA  
pH 8,0

10 x TBE-Puffer

100 mM Trisbase  
90 mM Borsäure  
1 mM EDTA (0,5 M)  
pH 8,0

10 x Williamspuffer

100 mM Tris-HCl (pH 8,3)  
500 mM KCl  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,01 % (w/v) Gelatine

Xylencyanol-Ladepuffer

0,25 % (w/v) Xylencyanol  
40 % (w/v) Saccharose

### 9.5.3 Medien

Bakterien-Dauerkulturmedium

0,85 ml Bakterienflüssigkultur in LB-Medium  
0,15 ml steriles Glycerin  
in Flüssigstickstoff schockgefrieren

Benzimidazolagar

36 mg/l Benzimidazol  
8 g/l Bitek-Agar

Kulturmedium M8

4,4 g/l (w/v) MS-Medium  
30 g/l Sorbitol  
8 g/l Bitek-Agar  
1,5 mg/l 6-BAP  
1,0 mg/l IBA  
pH 5,8

LB-Medium (Luria-Bertani)

1 % (w/v) Bactotrypton  
1 % (w/v) NaCl  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
1,5 % (w/v) Bitek-Agar (nur für festes Medium)

### Medium für Blau-Weiß-Selektion

LB-Medium (fest)  
100 µg/ l Ampicillin  
0,5 mM IPTG  
80 µg/ l X-GAL

### Wasseragar

8 g/l Bitek-Agar

## 9.6 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ABC-Transporter	Efflux-Pumpen der ATP Binding Cassette
A, C, G, T	Nukleinsäurebasen, Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
a.i.	active ingredient (Wirkstoff)
ANOVA	Analysis of Variance, Varianzanalyse
AOX	alternative Oxidase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
6-BAP	6- Benzylaminopurine
BASF	Badische Anilin- und Soda-Fabrik
BAZ	Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, jetzt: Julius-Kühn-Institut
bidest	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool, Programm zur Analyse biologischer Sequenzdaten
Bork.	Borkhausen
B & W	Bind & Wash
°C	Grad Celsius
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
cm	Zentimeter
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dest.	destilliert
DHPLC	Denaturing High Pressure Liquid Chromatography
DMI	Demethylase-Inhibitoren
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC	Effective Concentration
Eil.	Ellis
EU	Europäische Union
Ev.	Everhart
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alia (und andere)
e-Wert	erwartete Anzahl Hits beim BLAST, deren Score mindestens so groß ist wie der beobachtete
F129L	Mutation von Phenylalanin zu Leucin an Aminosäureposition 129
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
<i>f. sp.</i>	<i>forma specialis</i>
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit begrenzter Haftung
G137R	Mutation von Glycin zu Arginin an Aminosäureposition 137

G143A	Mutation von Guanin zu Alanin an Aminosäureposition 143
h	Stunde
IBA	Indol-3-Buttersäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRD	Infra Red Dye
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LG	Linkage Group
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	Mol
mA	Milliampere
MBC	Methyl-Benzimidazol-Carbamate
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mtDNA	mitochondriale DNA
n	Anzahl
na	not analysed/ nicht ausgewertet
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	pH-Wert
ppm	parts per million
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QoI	Quinone oxidising inhibitors
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	RNA abbauendes Enzym
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCAR	Sequence Characterised Amplified Region
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
s. o.	siehe oben
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Natriumchlorid-Natriumacetat-Natriumcitrat-Puffer
ssp.	Subspecies
SSR	Simple Sequence Repeat
t	Tonne
TAE	Tris-Acetate EDTA
Taq	Enzym aus <i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt
μ	micro
U	Unit (Einheit)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolettes Licht
ü. N.	über Nacht
V	Volumen
var.	Varietät
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
X-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
x	mal
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

## **Eigenständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, Juli 2010

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mit dieser wissenschaftlichen Arbeit noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen wurden.

Desweiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Dresden, Juli 2010

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei jenen Personen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. M.-Viola Hanke vom Julius-Kühn-Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst in Dresden-Pillnitz für die Bereitstellung des Themas und die hilfreichen Anregungen zum Manuskript. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Frank Dunemann für die Betreuung bei der Bearbeitung des Themas bedanken.

Herrn Prof. Dr. Holger B. Deising vom Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gilt mein ganz besonderer Dank für die freundliche Betreuung als Doktorvater während der Arbeit und für die wertvollen Anregungen besonders zu den Arbeiten zur Fungizidresistenz.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Andreas Peil und Herrn Dr. Henryk Flachowsky, die mir als Berater jederzeit und sehr kompetent zur Verfügung standen. Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Kerstin Neumann, die mich in allen praktischen Arbeiten und besonders bei der Kultur des Mehltaus sehr verlässlich unterstützt hat- ohne Dich wäre das nicht zu schaffen gewesen, Kerstin! Frau Ines Hiller danke ich für die vielfältige Hilfe im Laboralltag. Allen Mitarbeitern des Institutes für Obstzüchtung möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken, die Zeit am Institut für Obstzüchtung war dadurch sehr schön. Herr Dr. Alfred Trapp (LfULG Sachsen) und Herrn Dr. Olaf Krieghoff (Dresdener Obst E.G.) danke ich für die Bereitstellung von Proben. Den Projektpartnern im SMADIA-Projekt sei auch Dank dafür. Herr Daniel Vetter aus Hannover hat mich tatkräftig bei der Auswertung der Daten unterstützt, und das immer wieder aufs Neue, großen Dank auch dafür. Frau Dr. Stefanie Reim danke ich für die schöne gemeinsame Bürozeit und die hilfreiche Unterstützung beim Fertigstellen dieser Arbeit. Amir Mansour und Yasemin Dayioglu danke ich für die viele Unterstützung beim Durchhalten und Kopfhochhalten. Nicht zuletzt möchte ich meinem Vater für seine wunderbare Unterstützung danken, in der Beratung bei Problemen fachlicher und privater Art, in der Diskussion des Themas und im Korrekturlesen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Klaus Pillen vom Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich für die freundliche Zusage zur Begutachtung dieser Arbeit danken.

## Lebenslauf

Name: Silke Sabine Lesemann  
Geboren: 18.09.1974 in Braunschweig  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

### Ausbildung

07/1994 Abitur an der Neuen Oberschule Braunschweig  
09/1994 - 07/1996 Ausbildung zur Staudengärtnerin bei Günther Fuss  
Spezialkulturen, Königslutter am Elm  
09/1996 – 01/2002 Studium der Gartenbauwissenschaften an der Universität Hannover  
Diplomthema: "Host resistance to strawberry black spot  
(*Colletotrichum acutatum*) and variation among UK isolates for  
their pathogenicity and at the molecular level" bei Horticulture  
Research International, East Malling, Großbritannien

### Studienbegleitende Berufserfahrung

1998 – 2000 Studentische Hilfskraft im Institut für Genetik und Pflanzenzüchtung,  
Universität Hannover  
01/2001 – 06/2001 Studentische Hilfskraft im Institute for Plant Breeding and Biotechnology  
und Institute for Phytopathology, Horticulture Research International,  
East Malling, Großbritannien

### Berufstätigkeit

01/2002 – 01/2006 wissenschaftliche Angestellte an der Bundesanstalt für  
Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ), Institut für  
Obstzüchtung Dresden-Pillnitz  
Projekt: SMADIA "Sustainable production of apple and pear in Asia:  
understanding biology of scab and powdery mildew for developing  
integrated approaches of disease management"  
05/2006 – 12/2006 Assistant Plant Breeder bei Driscoll European Genetics, East Malling,  
Großbritannien  
seit 01/2007 in Elternzeit